



ENSP

ECOLE NATIONALE DE
LA SANTÉ PUBLIQUE

RENNES

Ingénieur du Génie Sanitaire

Promotion 2004

**EXPOSITION DES POPULATIONS AUX LÉGIONELLES
POTENTIELLEMENT CONTENUES DANS LES PANACHES
D'AÉRORÉFRIGÉRANTS DES CENTRALES NUCLÉAIRES**
*Éléments de réflexion sur les intérêts et limites de la
métrologie des aérosols pour l'évaluation du risque*

Présenté par
Géraldine GRANDGUILLOT

Ingénieur Traitement Eaux et Nuisances
Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers

Lieu du Stage :

EDF – Gaz de France
Service des Etudes Médicales, Paris

Accompagnant Professionnel :

Dr. France WALLET

Référent Pédagogique :

Dr. Jean LESNE

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Docteur Jacques LAMBROZO, Directeur du Service des Etudes Médicales (SEM) d'EDF (Electricité de France) et de Gaz de France, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pendant la durée de ce stage.

Mes remerciements s'adressent bien évidemment au Docteur France WALLET, Responsable des Risques Microbiologiques et de la Qualité au Service des Etudes Médicales, pour avoir accepté ma participation à son projet à l'occasion de ce mémoire de fin d'études. Elle a su rester disponible et efficace dans son rôle de référent professionnel, malgré un emploi du temps chargé. Je souhaite la remercier particulièrement pour m'avoir à la fois encadrée, conseillée et guidée dans mes actions tout en me laissant un espace de liberté m'ayant permis de découvrir, d'apprendre et de progresser par moi-même.

Je tiens également à remercier sincèrement le Docteur Pierre-André CABANES, Directeur-Adjoint du Service des Etudes Médicales pour s'être lui aussi réellement impliqué dans le suivi de mon stage et m'avoir fait bénéficier de sa compétence et ce, malgré ses contraintes professionnelles.

J'en profite pour exprimer chaleureusement ma gratitude, pour son accueil, son écoute et sa disponibilité, à l'ensemble du Service des Etudes Médicales d'EDF - Gaz de France et, en particulier, aux Docteurs Véronique EZRATTY et Sylvaine RONGA-PEZERET, ainsi qu'à Mesdames Maryse BANGRATZ, Maryvonne LE MERRER et Elisabeth PIGEON, avec qui j'ai travaillé pendant toute la durée de mon stage dans un climat à la fois efficace et amical. Elles ont su me faire partager leurs savoirs et faire de ce stage une expérience des plus enrichissantes tant sur le plan humain que professionnel.

C'est l'occasion pour moi de remercier également les chercheurs du département Recherche et Développement d'EDF (Chatou, 78), dont l'aide a contribué au bon déroulement de ce travail, à savoir Matthieu LE BRUN, Claire POUGNARD et Sylvie SOREAU, sans oublier bien sûr l'ensemble des agents EDF que j'ai pu côtoyer au cours de ce stage, à Saint-Denis (93) ou à Chinon (37) notamment.

Dans un deuxième temps, je tiens à remercier aussi le Docteur Enric ROBINE (Pôle Microbiologie des Environnements Intérieurs, Centre Scientifique et Technique du Bâtiment, Marne-La-Vallée, 77) pour sa sympathie, sa disponibilité et son écoute.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Monsieur Philippe DUQUENNE, Responsable d'Etudes au sein du Laboratoire de Métrologie des Aérosols à l'Institut National de Recherche et de Sécurité (Vandoeuvre-lès-Nancy, 54), qui a contribué aussi, par ses conseils, au bon déroulement de mon stage.

Tout naturellement, j'exprime ma sincère amitié aux autres stagiaires du SEM, à savoir Anne LANDRIN, étudiante en sixième année en Faculté de Pharmacie (Chatenay Malabry, 92) et Christophe MICHAUX, élève-ingénieur à l'Ecole Supérieure Angevine d'Informatique et de Productique (49), qui ont su créer une ambiance de travail agréable et me faire part de leur expérience. Je leur suis reconnaissante d'avoir su m'accorder leur soutien et leur attention, en particulier dans les moments les plus difficiles.

Enfin, je pense aussi au Docteur Jean LESNE. En tant que référent pédagogique à l'Ecole Nationale de la Santé Publique de Rennes (35), il a en effet su me prodiguer conseils et encouragements pendant toute la durée de mon stage et s'est toujours soucié de son bon déroulement et ce, malgré les contraintes liées à la distance.

Un grand merci à tous et sachez que je garderai le meilleur souvenir de ce stage...

Sommaire

Liste des sigles utilisés

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PARTIE 1</u>	
Cadre de travail sur l'exposition des populations aux panaches des centrales nucléaires :	
<i>Légionellose et tours aéroréfrigérantes, exposé du problème</i>	2
1. CONTEXTE ET ENJEUX DE L'ÉTUDE	2
1.1. Sur le plan sanitaire et environnemental	2
1.1.1. Rappels médicaux : agent infectieux et pathologies	2
1.1.2. Paramètres favorables à la multiplication des légionelles	3
1.1.3. Les conditions d'apparition de cas de légionelloses	3
1.1.4. Installations à risque	3
1.1.5. Bilan des investigations épidémiologiques	4
1.2. Sur le plan réglementaire et institutionnel	4
1.2.1. En quoi l'entreprise EDF est-elle concernée par les légionelles ?	4
1.2.2. Réglementation relative à la prévention du risque légionellose concernant les tours aéroréfrigérantes	5
1.2.3. La gestion du risque préconisée pour les tours aéroréfrigérantes	6
1.2.4. Evolution actuelle de la réglementation en matières de légionelles dans les tours aéroréfrigérantes	6
2. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU MÉMOIRE	7
2.1. Rôle du service d'accueil	7
2.1.1. Mission et domaines d'intervention du service	7
2.1.2. Risque microbiologique lié aux légionelles	7
2.2. Place dans la démarche d'évaluation des risques sanitaires	8
2.3. Objectifs du travail	9
<u>PARTIE 2</u>	
État des connaissances en matière de métrologie de la contamination biologique d'air :	
<i>Adaptation au cas des aérosols de légionelles</i>	10
1. INTRODUCTION	10
2. MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE DE L'AIR	11
2.1. Avant-propos	11
2.2. La sédimentation	11
2.3. L'impaction	11
2.3.1. Sur milieu solide	11
2.3.2. En milieu liquide	12
2.4. La filtration	13
2.5. Bilan	13

3. MÉTHODES D'ANALYSE DES LÉGIONELLES DE L'AIR	14
3.1. Introduction	14
3.2. Méthode de référence	14
3.3. Techniques cellulaires	16
3.3.1. Dénombrement direct	16
3.3.2. Approche de type immunologique	17
3.3.3. Biologie moléculaire	18
3.4. Techniques destructives	19
3.5. Bilan	21
4. CONCLUSION	22
<u>PARTIE 3</u>	
Méthodologie d'approche pratique de l'estimation de la contamination en légionelles autour d'aéroréfrigérants :	
<i>Exemple de démarches faisant appel à la métrologie des aérosols</i>	24
1. PRÉLIMINAIRES	24
2. DÉMARCHE ACTUELLE PAR LA MODÉLISATION DE LA DISPERSION DU PANACHE DU CNPE DE CHINON	25
2.1. Présentation	25
2.2. Méthodologie	25
2.3. Résultats	26
3. MESURE DES LÉGIONELLES DANS LES REJETS ATMOSPHÉRIQUES D'INSTALLATIONS INDUSTRIELLES LORS DE L'ÉPIDÉMIE DU PAS-DE-CALAIS	27
3.1. Avant-propos	27
3.2. Objet	27
3.3. Méthodologie	28
3.3.1. Collecte des biocontaminants	28
3.3.2. Localisation de l'échantillonnage pour les lagunes de l'entreprise Noroxo	28
3.3.3. Analyse des prélèvements	28
3.4. Résultats	28
3.5. Bilan : implication pour notre problématique	29
4. PRÉSENTATION DE LA CAMPAGNE DE MESURES DES AÉROSOLS DE LÉGIONELLES EN COURS SUR LE CENTRE NUCLÉAIRE DE CHINON	30
4.1. Cadre de l'étude	30
4.2. Matériel et méthodes utilisés	30
4.2.1. Collecte des aérosols biologiques	30
4.2.2. Plan d'échantillonnage	31
4.2.3. Types d'analyse des échantillons utilisés	32
4.3. Planning prévisionnel de la campagne de mesures	32
5. PROPOSITION D'ÉTUDE SUR CIRCUIT-PILOTE	32
5.1. Introduction	32
5.2. Présentation sommaire du moyen d'essai SPECTRE	33
5.2.1. Présentation des boucles	33
5.2.2. Fonctionnement global du circuit	33
5.3. Présentation sommaire du moyen d'essai PEEP	34

5.4. Analyse du besoin vis-à-vis de la problématique légionelles	35
<u>PARTIE 4</u>	
Analyse et discussion sur l'estimation de l'exposition des populations aux légionelles contenues dans les panaches des centrales :	
<i>Argumentaire sur l'intérêt et le sens du mesurage dans l'air</i>	36
1. AVANT-PROPOS	36
2. RÉSULTATS DE L'ÉTUDE DES ASPECTS THÉORIQUES ET PRATIQUES DE LA MÉTROLOGIE DES AÉROSOLS	36
2.1. Aboutissement de l'étude bibliographique sur les incertitudes de la métrologie des aérosols	36
2.1.1. Introduction	36
2.1.2. Principales incertitudes liées à l'échantillonnage de l'air	36
2.1.3. Récapitulation	38
2.2. Retour d'expérience des investigations autour de l'usine de Noroxo en termes de métrologie	39
2.2.1. Analyse de la stratégie adoptée	39
2.2.2. Interprétation des résultats de mesure du CSTB	41
2.3. Observations de terrain lors du début de la campagne de mesures sur le site du CNPE de Chinon	42
2.4. Utilités et limites d'un projet d'étude sur circuit-pilote pour estimer l'exposition des populations aux légionelles issues des panaches	44
3. CONSÉQUENCES DE L'UTILISATION DE LA MODÉLISATION DE LA DISPERSION DES LÉGIONELLES POUR L'ÉVALUATION DU RISQUE	45
4. PRISE EN COMPTE DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA SURVIE DES LÉGIONELLES DANS LES AÉROSOLS	47
5. RÉFLEXION SUR L'INTÉRÊT DES MESURES DANS LES AÉROSOLS ET PERSPECTIVES POUR LA SUITE DU PROJET	49
5.1. Bilan sur l'intérêt des mesures de légionelles dans les aérosols	49
5.2. Proposition de méthodologie pour des mesures dans l'air	51
5.3. Recommandations pour la localisation des points de prélèvement d'air	52
5.4. Interprétation de la validité des résultats et du rapport avec la réalité du risque	54
<u>CONCLUSION</u>	57
Bibliographie	59
Liste des annexes	63

Liste des sigles utilisés

ADN : Acide Désoxéribonucléique
AFNOR : Association Française de Normalisation
AFSSE : Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale
ARN : Acide Ribonucléique
BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract
BVNC : Bactérie Viable Non Cultivable
CNRL : Centre National de Référence des Légionelles
CNPE : Centre Nucléaire de Production d'Electricité
CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
COP : Compteur Optique à Particules
CSTB : Centre Scientifique et Technique du Bâtiment
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-Phényl Indole
DGS : Direction Générale de la Santé
DPN : Direction du Parc Nucléaire
DPPR : Direction de la Prévention des Pollutions et des Risques
DRIRE : Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement
EDF : Electricité de France
FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization
GVPC : Glycine Vancomycine Polymyxine Cycloheximide
ICPE : Installation Classée pour la Protection de l'Environnement
INB : Installation Nucléaire de Base
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
ISO : International Organization for Standardization
LCR : Ligase Chain Reaction
LNHE : Laboratoire National d'Hydraulique et d'Environnement
MAEA : Météorologie Appliquée et Environnement Atmosphérique
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEEP : Pilote d'Essai d'Entartrage de Packings
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
R&D : Recherche et Développement
RT-PCR : Retro-Transcriptase PCR
SEM : Service des Études Médicales
SPECTRE : Système Pilote d'Etude des Circuits Tertiaires de Refroidissement des Eaux
SP-PCR : Solid-Phase Polymerase Chain Reaction
TCS : Trypto Caséine Soja
TAR : Tour AéroRéfrigérante
UFC : Unité Formant Colonie
USEPA : United States Environmental Protection Agency

INTRODUCTION

Ces dernières années, la problématique du risque « légionelles » a largement été médiatisée suite à plusieurs épidémies. Aujourd'hui, la légionellose est devenue un problème de santé publique préoccupant, dont l'incidence est en constante augmentation. C'est une maladie dont on parvient désormais à mieux cerner les voies de contamination. Pourtant les conditions dans lesquelles surviennent les cas ne sont pas toujours parfaitement déterminées et les doses infectantes ne sont pas encore connues, faute notamment d'une méthode suffisamment performante de mesure des légionelles dans l'air.

Plusieurs types d'installations à risque ont été mis en cause suite aux investigations menées à l'issue d'épidémies, dont les principales sont les systèmes de distribution d'eau chaude sanitaire et les tours aéroréfrigérantes associées aux systèmes de climatisation. Afin de prévenir les risques sanitaires liés à la propagation des légionelles dans l'air ambiant en aval de réfrigérants atmosphériques, une réglementation va être édictée, visant en premier lieu ces deux types d'installations. La question de la transposition de cette réglementation aux tours industrielles de grande taille est actuellement en discussion. Ceci fait craindre à EDF de nouvelles contraintes pour ses propres installations, alors même que ces tours industrielles n'ont jamais été impliquées dans quelque événement épidémiologique et qu'un certain nombre de particularités propres aux grands aéroréfrigérants des centrales nucléaires EDF permettent d'avancer que l'exposition à des aérosols de grandes tours est très différente de celle imputée aux petites tours situées en milieu urbain. C'est pourquoi EDF souhaite évaluer les risques d'exposition aux légionelles au voisinage de ses ouvrages.

Le mémoire s'inscrit dans ce projet global d'évaluation du risque et a particulièrement trait à la caractérisation de l'exposition humaine. Jusqu'à présent, on utilise, pour la gestion du risque légionelles, une approche fondée sur la présence de l'agent dans l'eau. L'estimation de l'exposition se limite à la mesure de concentrations en légionelles dans l'eau des tours, suivie de la modélisation de la dispersion du panache sous hypothèses concernant l'aérosol émis. Aucune mesure dans l'aérosol issu des tours n'a encore été réalisée dans le cadre d'une évaluation du risque, alors que la contamination se produit par inhalation de légionelles aéroportées. C'est pourquoi une nouvelle approche de l'exposition a été envisagée par la métrologie des légionelles dans les aérosols. La question se pose alors de savoir si celle-ci pourrait s'avérer réellement pertinente en termes d'évaluation du risque sanitaire. Pour apporter des éléments de réponse, la démarche adoptée et présentée dans ce mémoire se décline en quatre parties.

Ce travail commence par un cadrage de la réflexion sur l'exposition des populations aux légionelles potentiellement contenues dans les panaches des centrales nucléaires. Un rappel du contexte et des enjeux permet de poser le problème lié aux légionelles et aux tours aéroréfrigérantes, ainsi que de fixer les objectifs de ce mémoire visant à répondre à la problématique qui se pose pour EDF.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, une étude bibliographique sur la métrologie des bioaérosols fait le point sur les méthodes existantes pour le prélèvement de l'air et l'analyse des légionelles de l'air.

Cette synthèse théorique est ensuite complétée par une présentation des approches envisageables, en pratique, pour mesurer la contamination de l'air par les légionelles. Cette troisième partie conduit à mettre en parallèle la démarche actuelle d'EDF pour l'estimation des expositions des populations aux légionelles, avec les possibilités qu'offre actuellement la métrologie des légionelles dans l'air.

Enfin, la quatrième et ultime partie porte sur l'intérêt et la signification au niveau sanitaire de la métrologie des aérosols de légionelles. La réflexion se base sur des éléments théoriques et pratiques rassemblés dans les parties précédentes. Les apports des différentes études ont été mis en parallèle avec les moyens utilisés actuellement au SEM pour estimer l'exposition, afin d'apporter des réponses et d'émettre des propositions ou recommandations sur les questions posées.

PARTIE 1

Cadre de travail sur l'exposition des populations aux panaches des centrales nucléaires :

Legionellose et tours aérorefrigérantes, exposé du problème

1. CONTEXTE ET ENJEUX DE L'ÉTUDE

1.1. Sur le plan sanitaire et environnemental

1.1.1. Rappels médicaux : agent infectieux et pathologies

En juillet 1976, un congrès de la Légion Américaine réunit 4 500 anciens combattants à Philadelphie. Deux cent vingt et un participants furent rapidement atteints d'une pneumopathie aiguë et fébrile. Le taux de létalité atteignit plus de 15 % [1]. Isolé en 1977, ce n'est qu'en 1979 que l'appellation de *Legionella pneumophila* fut donnée à ce micro-organisme, compte tenu des circonstances. Le terme de légionellose est choisi pour désigner toutes les infections dont les bactéries de ce type sont responsables.

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif. Le genre *Legionella* rassemble 43 espèces, dont une vingtaine ont déjà prouvé leur caractère pathogène et comporte 65 sérogroupes antigéniquement distincts [2]. Micro-organismes saprophytes, de taille comprise entre 0,5 et 0,7 µm en largeur et de 2 à 20 µm en longueur, les légionelles peuvent devenir pour l'homme des pathogènes opportunistes. *Legionella pneumophila* est l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine : 80 % des cas dont 90 % du séro groupe 1.

Les divers aspects cliniques de l'infection à *Legionella* vont de la forme asymptomatique à la pneumonie grave et rapidement progressive. Les légionelles sont à l'origine de la fièvre de Pontiac et de la maladie des légionnaires [3]. La fièvre de Pontiac est une forme bénigne correspondant à un syndrome pseudo-grippal, guérissant spontanément en 2 à 5 jours. La maladie des légionnaires est une pneumopathie aiguë qui nécessite l'administration rapide d'antibiotiques adaptés. Elle touche principalement les personnes fragilisées. Les facteurs de risque favorisant le développement de cette maladie sont en effet l'altération des défenses immunitaires (traitement immunosuppresseur, corticothérapie, chimiothérapie anti-cancéreuse, immuno dépression), les insuffisances respiratoires chroniques, le diabète, le tabagisme chronique, l'alcoolisme chronique, l'âge et le sexe masculin [4]. On y associe une létalité élevée, comprise entre 15 et 20 %, qui peut atteindre 40 % chez les malades hospitalisés et plus encore chez les immunodéprimés [5].

Ni l'examen clinique, ni la radiographie pulmonaire n'étant très spécifiques d'une légionellose, le diagnostic de la maladie est essentiellement de nature bactériologique.

Pour les prélèvements d'origine humaine, la technique de référence est la mise en culture. Le diagnostic de légionellose peut être confirmé au laboratoire grâce à différentes autres méthodes : détection d'anticorps dans le sang, détection d'antigènes solubles spécifiques du type *Legionella pneumophila* dans les urines. La détection par amplification génomique peut permettre de préciser la souche responsable dans le cadre d'une enquête de santé publique [6]. Ainsi, dans le cadre d'investigations de cas groupés, le Centre National de Référence des *Legionella* (CNRL) peut comparer, par des méthodes de typage moléculaire, le profil génomique des souches isolées chez les malades et dans l'environnement, afin de confirmer la source de contamination [7].

En France, depuis le décret n° 87-1012 du 11 décembre 1987, la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire. En 2002, en France, le nombre de cas déclarés de légionellose était de 1 021, dont 10% des cas d'origine nosocomiale, pourcentage qui représente un recul statistiquement significatif par rapport aux deux années précédentes [5]. La plupart des cas sont sporadiques et d'origine inconnue, les principaux lieux recensés à l'origine de contamination étant les hôpitaux, les hôtels et campings, les établissements thermaux, les maisons médicalisées et les maisons de retraite [5].

1.1.2. Paramètres favorables à la multiplication des légionelles

Les légionelles sont des bactéries hydro-telluriques, banales de notre environnement, retrouvées dans la plupart des habitats aquatiques. Plusieurs études montrent leur présence dans la quasi-totalité des eaux douces telles que les rivières, les lacs, les étangs [2]. Cependant, la présence ubiquitaire des légionelles est en apparence paradoxale pour des micro-organismes ayant des exigences de culture particulières. Ce contraste a suscité l'hypothèse selon laquelle les légionelles ne seraient pas toujours libres dans l'environnement mais hébergées par d'autres organismes, en particulier au sein de la microflore présente dans le biofilm (algues, protozoaires) [8]. L'inclusion de légionelles dans les kystes des amibes leur permettrait de survivre dans des conditions très défavorables (désinfectants, hautes températures) et par la suite de se développer. La multiplication des légionelles est aussi fonction d'autres paramètres. La légionelle peut proliférer dans les eaux stagnantes ayant une température comprise entre 0 °C et 63 °C et pour un pH compris entre 5,5 et 9,2. Elles survivent en deçà de 25 °C et se multiplient jusqu'à 43 °C. Vers les températures avoisinant les 50 °C, une destruction survient. De même, la salinité et les rayons ultraviolets inhibent sa croissance [4]. Ainsi, les lieux de prédilection du développement bactérien sont les ballons de production d'eau chaude sanitaire (lorsque la température de consigne est trop basse) et les bras morts des tuyauteries de distribution, des robinetteries et des diffuseurs de douche. Le développement des légionelles y est favorisé par les dépôts minéraux et organiques, la présence de certains matériaux comme le caoutchouc, le chlorure de vinyle, le polyéthylène ou le silicone qui favorisent la formation d'un biofilm [3]. De la même manière, les dépôts incrustants de tartre et les parties corrodées constituent des niches pour les légionelles qui y trouvent un refuge vis-à-vis des montées en température et des biocides, ainsi qu'une flore propice à sa prolifération [8].

1.1.3. Les conditions d'apparition de cas de légionelloses

Pour gérer au mieux le risque de légionellose, il convient d'examiner les situations pouvant conduire à l'infection. Or, pour qu'il y ait contamination humaine, plusieurs conditions doivent être réunies [9]. Il faut tout d'abord un milieu colonisé par des souches pathogènes de *Legionella* et à une concentration suffisante. La dose infectante est encore inconnue aujourd'hui et dépend elle-même de la pathogénicité de la souche en question. Dans les cas où l'origine de la contamination probable a été retrouvée dans des tours aéroréfrigérantes, il semble que l'eau contenait plus de 10⁵ légionelles par litre [3]. Mais, pour que le risque sanitaire apparaisse, il faut qu'il y ait une exposition, c'est-à-dire inhalation d'un aérosol (microgouttelettes en suspension dans l'air) fin formé à partir du milieu colonisé par ces *Legionella*. La taille des gouttes de cet aérosol doit être inférieure à 10 voire 5 µm pour que les *Legionella* arrivent jusqu'aux alvéoles pulmonaires [9]. La transmission aérienne par inhalation d'eau contaminée diffusée en aérosol est actuellement le seul mode reconnu de contamination formellement établie. Aucun cas de transmission interhumaine de légionellose n'a été rapporté, ce n'est pas une maladie contagieuse. D'autres modes de transmission sont possibles, comme la contamination par instillation directe (ventilation assistée), mais n'ont pas été prouvés [7].

1.1.4. Installations à risque

Les réservoirs naturels sont très rarement à l'origine de légionelloses, à la différence des eaux « domestiquées » qui constituent des sites de prolifération et de dissémination [10]. Les installations à risque sont celles susceptibles de générer un aérosol à partir d'une eau présentant les conditions écologiques favorables au développement des légionelles [2]. Ces installations peuvent produire des aérosols, lorsque l'eau est pulvérisée, en bouillonnement ou impactée à forte pression sur une surface. Les réseaux de distribution d'eau chaude sanitaire alimentant les douches, les systèmes de climatisation et tours aéroréfrigérantes, les bains à remous ou les bains à jets, les humidificateurs, brumisateurs ou nébulisateurs respiratoires, les installations de balnéothérapie et de

thermalisme, les dispositifs de douches, les fontaines décoratives et les nettoyeurs à haute pression sont autant d'installations et de dispositifs pouvant conduire à une contamination de l'homme [3].

Toutefois, parmi les tours aéroréfrigérantes, seules celles dites humides sont concernées. Les tours aéroréfrigérantes ont en effet pour fonction d'évacuer vers le milieu extérieur la chaleur issue de systèmes de refroidissement en pulvérisant de l'eau chaude dans un flux d'air. Cette circulation d'air permet de refroidir l'eau par vaporisation d'une partie de l'eau pulvérisée. Cette vapeur d'eau est parfois visible sous la forme d'un panache au-dessus de la tour [11]. Les tours sèches, pour lesquelles l'air seul sert à évacuer la chaleur, ne posent donc pas de problème de formation d'aérosols.

1.1.5. Bilan des investigations épidémiologiques

Depuis 1996, l'accroissement observé du nombre de cas déclarés de légionellose est lié à un meilleur diagnostic de la maladie et à plus de rigueur dans la déclaration des cas. Mais il signifie aussi que les sources de contamination ne sont pas correctement maîtrisées [10]. On ne connaît l'origine de la contamination que dans une minorité des cas.

Les premières études ayant mis en évidence la relation entre les cas de maladie et la contamination de tours aéroréfrigérantes sont des investigations d'épidémies nosocomiales où la prise d'air d'un bâtiment de l'hôpital se trouvait sous le vent d'une tour du système de climatisation d'un autre bâtiment. Une autre origine correspond au cas de personnes passant à proximité d'un immeuble équipé d'une tour colonisée par les bactéries et exposées aux émissions de microgouttelettes. Ce mode de contamination est envisagé lors des épidémies survenues à Paris en 1998 et 1999 [12].

Grâce à l'investigation des épidémies, on sait que la majorité des cas répertoriés a été imputée à l'eau chaude sanitaire et aux petites tours de refroidissement associées aux systèmes de traitement d'air des immeubles. Dans ces cas, l'eau chaude sanitaire et l'eau de la tour étaient généralement fortement colonisées par les légionelles.

Mais les épidémies récentes de légionellose au cours de l'été 2002 (à Sarlat, Meaux en France et à Barrow-in-Furness au Royaume-Uni) ainsi qu'au cours de l'été 2003 (à Montpellier et à Poitiers) et en début de l'année 2004 (région de Lens) ont montré que les tours aéroréfrigérantes installées en milieu industriel peuvent aussi être à l'origine d'épidémies conséquentes.

En revanche, on en sait peu sur les cas survenant de façon sporadique. Il n'a en particulier jamais été publié d'étude établissant un lien entre l'apparition de cas de maladie des légionnaires et l'exposition aux panaches des aéroréfrigérants industriels de grande taille, du type de ceux utilisés dans les centrales d'EDF.

1.2. Sur le plan réglementaire et institutionnel

1.2.1. En quoi l'entreprise EDF est-elle concernée par les légionelles ?

Dans les centrales nucléaires, les zones de développement potentiel des légionelles sont les réseaux d'eau chaude sanitaire, les systèmes de climatisation, les structures d'échange des aéroréfrigérants (« packings »), les biofilms des circuits et des bassins. Comme tout autre industriel, les groupes EDF et Gaz de France sont donc concernés par le risque de légionellose en tant qu'utilisateurs d'eau chaude sanitaire et de tours aéroréfrigérantes associées aux systèmes de traitement d'air des bâtiments. Du reste, EDF est également concernée de manière plus spécifique, d'une part, en tant que promoteur des systèmes de climatisation et de production d'eau chaude sanitaire et, d'autre part, dans son rôle de producteur pour les centrales thermiques ou nucléaires équipées d'un système de refroidissement en circuit fermé (avec des tours aéroréfrigérantes). C'est en particulier cette dernière raison d'intérêt de la part d'EDF pour les légionelles qui va nous intéresser dans le cadre de ce mémoire.

Dans les Centres Nucléaires de Production d'Électricité (CNPE), l'énergie thermique libérée par la fission des atomes d'uranium est transformée en énergie mécanique puis

électrique. Ce processus industriel peut être divisé en trois secteurs. Il est présenté sous forme schématique en Annexe 1. La chaleur produite sert à chauffer l'eau du circuit primaire à plus de 300 °C et sous une pression de 155 bars [13]. Toujours sous forme liquide du fait de la pression, cette eau chargée en éléments radioactifs reste en circuit fermé. Dans le circuit secondaire, l'eau du circuit primaire est refroidie en passant dans les tubes des générateurs de vapeur. Au contact de ces tubes, l'eau du circuit secondaire se vaporise et la vapeur produite entraîne le groupe turboalternateur qui produit de l'électricité. Enfin, le circuit tertiaire condense la vapeur du secondaire [14]. L'air atmosphérique est alors utilisé pour refroidir l'eau du circuit tertiaire dans un circuit de refroidissement couplé à une tour aéroréfrigérante [13].

Depuis le condenseur, l'eau arrive dans le bassin chaud (30-40 °C) et est projetée sous forme de gouttelettes. Elle retombe alors dans les plaques (« packings ») dont le rôle est d'optimiser l'échange thermique en augmentant la surface de contact entre l'eau pulvérisée et l'air ascendant (contre-courant). L'eau tombe finalement dans un bassin d'appoint, dit bassin froid (20-30 °C), excepté une partie entraînée sous forme de micro-gouttelettes (effet dit « de primage »). Un tirage naturel permet l'ascension de l'air ambiant réchauffé dans la tour et sa sortie dans l'atmosphère formant ainsi le panache visible du fait de la recondensation de l'eau entraînée. C'est cette eau en suspension dans l'air qui constitue un aérosol s'échappant de l'aéroréfrigérant.

Dans le cas du CNPE de Chinon, le principe est le même mais la hauteur de la tour étant insuffisante (contraintes paysagères), il est nécessaire que des moto-ventilateurs soient installés en haut de la tour [14].

L'eau brute utilisée est déjà naturellement chargée en légionelles et on retrouve fréquemment de très bonnes conditions de développement dans les aéroréfrigérants des centrales : présence d'amibes et de nutriments (algues), température de l'eau variable mais toujours favorable à ces bactéries, etc [13]. D'après différentes études, on sait que les légionelles peuvent passer dans les aérosols et y survivre un certain temps. Malgré la présence d'un séparateur de gouttelettes dans l'aéroréfrigérant, permettant de les retenir, les aérosols formés peuvent passer dans le panache en entraînant avec eux des légionelles. La présence de ces bactéries dans le panache pourrait donc entraîner des répercussions sur la santé des populations environnantes.

1.2.2. Réglementation relative à la prévention du risque de légionellose concernant les tours aéroréfrigérantes

Pour lutter contre la légionellose, des mesures de gestion des installations à risque ont été mises en place à travers plusieurs textes de la Direction Générale de la Santé et du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable à l'encontre des installations à risque [3].

La Circulaire DGS n° 98/771 du 31 décembre 1998 concerne la mise en œuvre des bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et les moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans des bâtiments recevant du public (hôtels, maisons de retraite non médicalisées, centres d'hébergement, complexes sportifs, campings, bains à remous et bains à jets...) [15].

Suite à des cas enregistrés en milieu hospitalier et à l'épidémie parisienne de l'été 1998 associée à la contamination d'une tour aéroréfrigérante, se basant sur les travaux développés à Paris, une circulaire et un modèle d'arrêté préfectoral, joint à la circulaire, ont été adressés par le ministre chargé de l'environnement aux préfets le 23 avril 1999, afin de compléter ces instructions [10].

A cette réglementation de portée générale s'ajoute une réglementation sur les tours aéroréfrigérantes en particulier : la Circulaire DGS n° 2003/306 du 26 juin 2003 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les tours aéroréfrigérantes des établissements de santé [16]. La circulaire renforce les mesures de prévention du risque lié aux légionelles dans les tours aéroréfrigérantes des établissements de santé et dans celles situées dans l'enceinte de l'établissement.

Enfin, l'Arrêté du 30 juillet 2003, relatif aux chaudières présentes dans des installations de combustion existantes d'une puissance supérieure à 20 MWth, stipule les mesures de

prévention de la légionellose devant être prises lorsque des tours aéroréfrigérantes sont associées à ce type d'installation.

1.2.3. La gestion du risque préconisée pour les tours aéroréfrigérantes

Actuellement, la gestion du risque lié aux légionelles se fonde sur les conclusions d'un groupe de travail piloté par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) mis en place en octobre 1999, ayant pour mission de définir les outils de gestion du risque lié aux légionelles. Le rapport issu de ce travail en novembre 2001 est disponible sur le site internet du Ministère chargé de la Santé [10]. Il propose des recommandations pour l'environnement et fixe des règles d'entretien, de maintenance et de suivi des tours, avec recours à des désinfections curatives ou préventives en cas de nécessité [11].

Ainsi, ce rapport recommande également différents niveaux d'intervention en fonction des concentrations en légionelles mesurées dans l'eau des tours aéroréfrigérantes, à savoir 10^3 UFC/L (Unité Formant Colonie par Litre), seuil cible à ne pas dépasser et 10^5 UFC/L, seuil d'arrêt de l'installation avec obligation de vidange, nettoyage et désinfection avant la remise en service.

En ce qui concerne les grandes tours industrielles, le CSHPF précise que : «...ces installations comportent des spécificités. Par conséquent, les seuils décrits précédemment pourront être éventuellement adaptés au cas par cas en fonction des résultats de l'étude d'évaluation des expositions liées à l'installation ».

Le problème actuel est alors de déterminer quel niveau d'exigence doit être requis pour les grandes tours des installations nucléaires. En effet, parmi les spécificités des grandes tours industrielles, on peut citer les suivantes [2]. D'une part, l'efficacité des séparateurs de gouttelettes des grandes tours serait plus importante que pour les petites tours. D'autre part, le panache monte, la plupart du temps, à une hauteur très élevée (> 500 m) et le coefficient de dispersion atmosphérique est important. La dispersion du panache est ainsi très importante en sortie de la grande tour, ce qui détermine de longues durées de portage dans l'air pour les légionelles. Enfin, l'implantation des CNPE en zones rurales limite les populations exposées. Ce n'est donc pas le cas des petites tours incriminées dans plusieurs épidémies récentes. Pour une même valeur à l'émission, on peut donc supposer que les concentrations au sol sont inférieures pour les grandes tours industrielles et que le risque sanitaire est donc moindre.

Un guide interministériel (Santé, Environnement, Industrie) de bonnes pratiques de gestion des tours de refroidissement, relatif au risque lié aux légionelles, a également été édité en juin 2001 et diffusé par la Direction Générale de la Santé. Il comprend des recommandations en matière de conception des tours, d'opérations de maintenance, d'entretien et de surveillance de ces installations.

Cependant, l'ensemble de cette gestion du risque pour les tours se base donc sur des résultats de cultures bactériennes dans l'eau du circuit de refroidissement, mettant en évidence les bactéries viables et cultivables, et non sur une mesure dans l'aérosol au lieu d'exposition. Une question sous-jacente se pose donc : quelle concentration dans l'air au niveau de la zone d'exposition est induite par une concentration donnée en *Legionella* dans l'eau des circuits ? Pour mieux apprécier ce risque, cette question de mesure de concentrations en légionelles doit donc être abordée dans le cadre d'une démarche qui a pour but d'estimer l'impact potentiel d'une activité ou d'une installation sur la santé humaine.

1.2.4. Évolution actuelle de la réglementation en matière de légionelles dans les tours aéroréfrigérantes

Dans le cadre de la réglementation actuelle, les tours aéroréfrigérantes (TAR) des centrales ne sont pas en tant que telles des installations soumises à la réglementation des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (Loi du 19 juillet 1976

relative aux ICPE). Les tours industrielles ne sont classées que si elles sont connexes à des installations soumises au code des installations classées. Dans ce cas, elles peuvent donc dépendre de plusieurs rubriques des ICPE, la plupart des tours étant toutefois connexes à des installations de réfrigération par compression qui dépendent de la rubrique 2920 du code de l'environnement. Suite à la Circulaire du 23 avril 1999 émise par le Ministère chargé de l'Environnement, tous les préfets de département ont inclus des dispositions relatives à la prévention de la légionellose dans cette rubrique du Code de l'Environnement.

Cependant, les épidémies de légionellose dont la source est une tour aéroréfrigérante ont montré que cette réglementation est en partie inadaptée et mal connue des industriels.

Afin de remédier à cette situation, la Direction de la Prévention des Pollutions et des Risques (DPPR) du ministère chargé de l'Environnement et la Direction Générale de la Santé ont décidé, en novembre 2003, de mettre en œuvre un plan d'action interministériel de prévention des légionelloses comprenant notamment, pour 2004, la réactualisation du guide des bonnes pratiques édité en 2001, la création d'une rubrique unique ICPE couvrant les TAR et la réalisation d'un inventaire complet des installations concernées.

Certes, les tours des centrales ne sont pas soumises à la réglementation ICPE, puisqu'elles sont incluses dans un périmètre INB (Installations Nucléaires de Base), mais une extension de cette réglementation aux installations de type INB est envisageable. La problématique TAR est donc de plus en plus prise en compte sur le plan réglementaire d'où la nécessité pour EDF, dans le cadre de sa politique environnementale, d'engager des démarches efficaces de maîtrise du risque légionelles lié aux aérosols issus des tours de ses centrales.

2. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU MÉMOIRE

2.1. Rôle du service d'accueil

2.1.1. Mission et domaines d'intervention du service

Le Service des Etudes Médicales (SEM) d'EDF et de Gaz de France a pour mission d'apprécier les conséquences sanitaires éventuelles de l'activité des deux entreprises sur l'environnement, qu'il s'agisse de la production, du transport ou de la distribution d'énergie. Equipe pluridisciplinaire associant médecins et ingénieurs, le SEM est une structure restreinte de conseil et d'aide à la décision dans le domaine de la santé, plus particulièrement dans ses rapports avec l'environnement. Cette démarche s'intègre dans le cadre des orientations d'EDF et de Gaz de France en matière de développement durable. La prise en compte de la dimension sanitaire dans la gestion de l'environnement industriel et l'attention portée à l'émergence de nouveaux risques en sont autant de composantes essentielles.

La plupart des études menées par le SEM s'appuient sur l'évaluation quantitative des risques pour la santé humaine. Il s'agit d'un cadre méthodologique standardisé qui a été conçu pour aider à la décision dans un contexte d'incertitude, notamment lorsque les connaissances scientifiques sont lacunaires ou quand les phénomènes étudiés ne sont pas observables. Il permet d'établir des stratégies de gestion du risque sanitaire scientifiquement fondées : définition de valeurs limites d'exposition humaine, de normes d'émission ou de dépollution, mais aussi établissement de priorités dans le calendrier des réglementations et des programmes de recherche.

2.1.2. Risque microbiologique lié aux légionelles

Face à ce contexte réglementaire de plus en plus sévère et face à l'actualité en matière de légionelloses, avec notamment l'épidémie du Pas-de-Calais (usine Noroxo) et la mise en cause de tours aéroréfrigérantes associées à des process industriels, le groupe EDF-Gaz de France souhaite savoir quel niveau de risque elle fait courir aux populations habitant aux alentours des tours des centrales nucléaires.

Pour mieux apprécier ce risque, le SEM a entrepris des travaux suivant deux voies complémentaires de recherche, à savoir l'épidémiologie et l'évaluation des risques sanitaires.

Pour ce qui est de l'approche épidémiologique, une première enquête rétrospective sur deux années (1996-1997) a été conduite en 1998 à partir des données enregistrées par la médecine de contrôle, pour les agents potentiellement exposés travaillant en CNPE. Elle a confirmé qu'aucun cas de légionellose lié à ce type d'exposition n'a été observé parmi les salariés grâce à l'examen des causes d'arrêt maladie et du dossier médical. Pour le public, il n'y a jamais eu non plus de déclaration de cas de légionellose pouvant être associée à l'exposition au panache d'une tour industrielle de grande taille du type de celles utilisées dans les centrales EDF. Du fait de la rareté de la maladie, il était illusoire de se lancer dans une étude prospective portant sur les maladies. Aussi le SEM s'est orienté vers l'étude d'un marqueur d'exposition (anticorps dirigés contre *Legionella pneumophila*) chez les travailleurs exposés ou non aux panaches des aéroréfrigérants de plusieurs centrales. Cette enquête de séroprévalence a montré qu'aucun volontaire, quelle que soit la centrale étudiée, n'a présenté de sérologie positive au sens diagnostique et il n'y a pas de différence significative entre les taux de séropositivité des différents groupes d'exposition. Elle a donc confirmé qu'aucun cas rapporté aux émissions de ce type n'était avéré sur les sites.

Mais l'étude de séroprévalence du SEM n'offre qu'une puissance statistique réduite du fait de la faible prévalence retrouvée ; de plus, elle ne comportait pas d'évaluation précise de l'exposition au panache. C'est pourquoi, dans un deuxième temps, l'autre approche du risque de légionellose menée actuellement par le SEM est celle de l'évaluation des risques sanitaires, dans le but d'appuyer les résultats de l'approche épidémiologique et de permettre à EDF d'apporter des réponses à la question de la dangerosité de ses tours. Ce type d'étude consiste jusqu'à présent à estimer le risque de légionellose à partir de la modélisation des différentes étapes : passage des légionelles dans les aérosols et au travers du séparateur de gouttelettes, dispersion des aérosols dans l'atmosphère, survie des légionelles dans les aérosols et suivant les conditions météorologiques, retombée, exposition des populations, relation dose/effet ou dose/réponse.

C'est sur ce point précisément que ce mémoire trouve toute sa légitimité et tout son intérêt dans le cadre de ce projet. Il subsiste effectivement une multitude d'incertitudes dans la méthode d'évaluation des risques sanitaires et un grand besoin de connaissances relatives aux légionelles en particulier, d'où la nécessité d'y trouver encore des voies de progrès.

2.2. Place dans la démarche d'évaluation des risques sanitaires

Le mémoire s'inscrit dans un projet global d'évaluation du risque lié à la présence de légionelles dans les aéroréfrigérants des centrales.

Cette approche comprend classiquement quatre étapes :

- L'identification du danger : ici, on considère la légionellose
- La caractérisation du danger (relation dose-réponse)
- L'évaluation de l'exposition des populations : quelle population est en contact avec les légionelles ? Où, comment et pendant combien de temps ?
- La caractérisation du risque (excès de risque individuel ou impact global).

C'est sur la troisième étape que se focalise plus précisément le mémoire, étape qualitative et quantitative, la plus complexe de l'évaluation des risques sanitaires.

L'évaluation des risques pour la santé liés à l'inhalation de substances dispersées dans l'air sous forme de particules implique la connaissance de l'exposition des personnes concernées.

L'exposition, dont la définition générale est le contact entre un organisme vivant et une situation ou un agent dangereux, peut aussi être considérée comme la concentration de la particule infectieuse dans le ou les milieux contaminés mis au contact de l'homme, à

savoir l'air. L'évaluation de l'exposition consiste donc, d'un côté, à identifier les personnes exposées (âge, sexe, caractéristiques physiologiques, éventuelles pathologies et sensibilité, budgets espace-temps, effectif) et, de l'autre, à quantifier la fréquence, la durée et l'intensité de l'exposition à ces substances, exprimée par une dose moyenne journalière ou, pour l'inhalation, par une concentration dans l'aérosol.

L'exposition doit être évaluée en utilisant la fraction d'aérosol la plus pertinente au regard du risque connu, à savoir la fraction alvéolaire (particules de diamètre inférieur à 5 µm), mise en cause dans le cas de l'exposition aux légionelles, qui est aussi la plus dangereuse pour la santé selon la norme européenne EN 481 relative à l'échantillonnage des aérosols [17].

Ainsi, au vu des modalités d'exposition définies précédemment, l'objectif de cette étape est donc de connaître les milieux contaminés, c'est-à-dire, dans le cas des tours aéroréfrigérantes, la portée du panache contaminé dans l'atmosphère.

Suite aux résultats de mesures réalisées dans les centrales EDF montrant des concentrations importantes en légionelles dans l'eau des circuits de refroidissement des centrales, EDF s'interroge sur l'éventualité d'une contamination des panaches de tours aéroréfrigérantes. Or, aujourd'hui, aucune mesure dans l'aérosol issu des tours n'a encore été réalisée de manière fiable dans le cadre d'une évaluation de risque, alors qu'il s'agit du vecteur d'exposition aux légionelles pouvant être contenues dans les panaches. Jusqu'à présent, les mesures de concentration en légionelles se font uniquement dans l'eau de la tour (selon la méthode normalisée) et, en l'état actuel des connaissances, le coefficient de transfert des légionelles de l'eau vers l'air n'est pas connu. C'est pourquoi EDF souhaite, dans le but d'améliorer l'évaluation du risque sanitaire lié à la présence de légionelles dans l'air au niveau de ses grandes tours aéroréfrigérantes, envisager l'approche de l'exposition des populations, au niveau des tours aéroréfrigérantes de certaines centrales nucléaires, par la métrologie des légionelles dans les aérosols.

Dans un premier temps et dans le cadre de ce mémoire, il a été envisagé de mener l'ensemble de cette réflexion en se focalisant sur le site de Chinon, et cela pour plusieurs raisons : la hauteur des tours aéroréfrigérantes dites « tronquées » (28 m au lieu de 125 à 178 m pour les grandes tours classiques) induit une retombée rapide du panache et la concentration en légionelles dans l'eau des tours est *a priori* plus importante que sur les autres CNPE (Annexe 2). Malgré la présence de ventilateurs intégrés aux aéroréfrigérants, la dispersion du panache n'est pas équivalente à celle des aéroréfrigérants plus hauts. De ce fait, les mesures dans l'air seraient d'autant plus pertinentes. Le projet global d'évaluation de risque sera cependant par la suite élargi aux autres centres nucléaires d'EDF.

2.3. Objectifs du travail

L'évaluation de l'exposition à des polluants particuliers dispersés dans l'air requiert évidemment aussi la maîtrise d'un certain nombre de connaissances sur les aérosols [17]. La problématique du recours à la métrologie des aérosols dans le cadre de l'évaluation des expositions amène encore des incertitudes, puisqu'on est confronté à un manque de techniques adaptées. Pour remédier à ces difficultés de métrologie, il serait nécessaire de disposer de techniques de prélèvement d'aérosol et d'identification des légionelles fiables.

Au-delà des aspects théoriques de l'évaluation de l'exposition, l'objectif de ce mémoire consiste à réfléchir sur les facteurs influençant l'estimation de l'exposition des populations aux légionelles contenues dans les aérosols issus des centrales d'EDF. En effet, la caractérisation des expositions impose la réponse à deux questions majeures :

- Savoir où effectuer la recherche de la contamination éventuelle : dans les circuits de refroidissement, dans les panaches de rejets, dans l'environnement ?
- Pouvoir mesurer rapidement et pour des échantillons nombreux l'éventuel niveau de contamination en légionelles.

Or, l'intérêt du travail métrologique réside dans le respect de l'exigence forte, propre à toute estimation de la contamination, qu'est la représentativité, à la fois dans l'espace et dans le temps, des mesures effectuées selon le protocole choisi et le type de résultat obtenu. Ainsi, deux axes de réflexion peuvent être dégagés autour de l'évaluation de la contamination par les légionelles : d'une part, la localisation des points de mesure et le protocole de prélèvement d'échantillons et, d'autre part, le sens des mesures par les nouvelles techniques au regard de la réalité du risque.

Finalement, l'objet de ce mémoire se situe donc en amont de la caractérisation de l'exposition humaine aux légionelles contenues dans les panaches issus des tours aéroréfrigérantes industrielles. La démarche envisagée combine une bibliographie, des observations de terrain et la connaissance des travaux de recherche en cours ainsi que des investigations réalisées lors de l'épidémie du Pas-de-Calais. Dans un premier temps, l'étude bibliographique, ainsi que le retour d'expérience du Pas-de-Calais, permettent de se caler en terme de métrologie des légionelles et d'évaluer ce qui est envisageable pour répondre à notre problématique. Ensuite, après avoir rassemblé des éléments de réponse sous deux angles, à la fois théoriques et pratiques, il s'agit de commencer une réflexion sur les modalités et la validité des mesures dans le cadre de la caractérisation de l'exposition vis-à-vis du risque sanitaire encouru par les populations. L'objectif général est *in fine* d'aborder la signification et l'intérêt des mesures de la contamination en légionelles dans les aérosols pour mener une évaluation du risque légionelles par rapport aux mesures dans l'eau.

PARTIE 2

État des connaissances en matière de métrologie de la contamination biologique de l'air :

Adaptation au cas des aérosols de légionelles

1. INTRODUCTION

La phase d'étude des expositions correspond à une évaluation des interactions entre le pathogène, l'environnement et la population. Elle fournit des indications qualitatives mais aussi quantitatives sur l'importance, la fréquence et les voies d'exposition. Par conséquent, il est nécessaire, en amont de la caractérisation de l'exposition, de procéder à l'estimation de la contamination de l'air, milieu d'exposition des populations, par les bactéries dans notre cas. La problématique du sujet de mémoire nous amène alors à nous focaliser sur les bioaérosols et en particulier sur les légionelles. Or, on a déjà une idée de ce qui se passe dans l'eau pour ces bactéries, mais pas dans l'air, alors que c'est là qu'a lieu l'exposition des populations. Afin de savoir si la métrologie des légionelles dans les aérosols peut répondre à nos besoins, il convient de s'intéresser aux techniques disponibles avec une approche bilatérale, reposant à la fois sur les aérosols et sur les légionelles.

Comme dans toute démarche analytique classique, le mesurage des légionelles de l'air résulte de l'échantillonnage de l'air puis de l'analyse de l'échantillon recueilli. Chacune de ces deux étapes peut être réalisée selon différentes techniques, dont les principales connues en l'état actuel de l'art sont présentées dans cette synthèse bibliographique. Plusieurs procédés de mesurage des légionelles sont en effet disponibles sur le marché, mais présentent des conditions et des domaines d'utilisation différents. Avant de choisir une démarche de travail, il est donc nécessaire de procéder à un examen des avantages et limites des méthodes expérimentales et analytiques.

Cette partie théorique sur la métrologie des bioaérosols commence ainsi par une revue des principales techniques de prélèvement d'air utilisables, puis suit une présentation en

trois niveaux d'approche des méthodes d'analyse de légionelles existantes. L'accent sera plus porté sur les aspects liés à l'incertitude des mesures et aux possibilités d'adaptation à la métrologie des légionelles dans les aérosols.

2. MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE DE L'AIR

2.1. Avant-propos

Les méthodes d'échantillonnage utilisables pour le mesurage de microorganismes en suspension dans l'air sont très nombreuses. Dans le cadre de cette étude, nous nous limiterons aux prélèvements statiques de l'air, qui sont actuellement les plus utilisés. Ceux-ci font appel à quatre méthodes différentes dont l'une est dite passive, la sédimentation, alors que les trois autres nécessitent une aspiration d'air : l'impaction sur une surface solide, le barbotage dans un liquide et la filtration. Aussi, l'Association Française de Normalisation a défini une norme au sujet des dispositifs d'échantillonnage des bioaérosols disponibles (AFNOR, EN 13098-2000), à laquelle il est possible de se référer, mais elle a été surtout établie pour évaluer l'exposition sur les lieux de travail [18]. Par ailleurs, des protocoles de mesure de l'aérobiocontamination font actuellement l'objet d'un projet de norme de l'International Organization for Standardization (ISO DIS 14698). Nous dressons ici un inventaire des techniques existantes et de leurs limites.

2.2. La sédimentation

Cette première technique consiste à exposer un milieu nutritif (boîte de Pétri) à l'air ambiant pendant une durée choisie arbitrairement. Etant donné que le dépôt de particules viables sur le milieu dépend non seulement de leur poids, mais aussi des forces électrostatiques ou des poussées par flux d'air, le manque de représentativité à la fois quantitative (absence de relation directe entre la concentration de germes dans l'air et le nombre d'agents recueillis sur milieu) et qualitative (les germes collectés ne représentent pas forcément l'ensemble des populations microbiennes aérosolisées) de la sédimentation en font une méthode contestée dans la plupart des cas [19]. Elle est non volumétrique puisqu'elle recueille uniquement les particules sédimentables. Le seul avantage qui pourrait justifier l'utilisation d'un tel procédé contesté réside dans son faible coût et sa simplicité.

2.3. L'impaction

On dit qu'il y a impaction lorsqu'une particule qui se déplace atteint une vitesse de dérive suffisante pour s'éloigner, sous l'effet de son inertie, de sa ligne de courant et venir dans ou sur une surface liquide ou solide. Les systèmes basés sur l'impaction permettent ainsi de séparer des particules de tailles différentes présentes dans un courant gazeux [18].

2.3.1. Sur milieu solide

Le procédé consiste à interposer le support de collecte (milieu de culture solide ou semi-solide) sur le trajet du flux d'air aspiré. L'air balaie cette surface et les particules sont projetées sur le support du fait de leur inertie. La chance pour les particules d'être captées augmente avec leur vitesse et donc avec leur taille et leur masse. Les supports sont ensuite directement cultivés et les colonies comptées [18].

L'appareil utilisé à cet effet est appelé « biocollecteur » et est constitué d'un embout en forme de trou ou de fente de taille variable. Il existe trois approches méthodologiques pour l'impaction : l'impaction directe, l'impaction à fente et l'impaction centrifuge [19].

Dans le premier cas, une boîte de Pétri contenant une substance nutritive est placée directement sur le trajet du flux d'air, sous une grille d'aspiration, dont les caractéristiques déterminent l'efficacité d'échantillonnage des appareils, en particulier le nombre et le diamètre des orifices. En outre, cette technique permet de sélectionner les particules présentes en fonction de leur diamètre aérodynamique lorsque sont utilisés des

impacteurs à plusieurs étages (« appareils d'Andersen »). Le but d'un tel système de deux à six boîtes de Pétri superposées en « cascade » sous des grilles d'aspiration, dont le diamètre des orifices est décroissant, est de reproduire ainsi le dépôt sélectif des particules aux différents niveaux de l'arbre bronchique.

Dans le cas de l'impaction à fente, le support du milieu de culture tourne sous une ou plusieurs fentes d'aspiration de telle sorte que les particules du flux d'air recueillies soient réparties sur toute la gélose de manière homogène. La vitesse de rotation du support et la taille des fentes déterminent la répartition des particules sur le milieu. Certains de ces appareils peuvent prélever à un fort débit (jusqu'à 700 L / min), ce qui permet de recueillir des volumes d'air importants en un temps réduit (de l'ordre de quelques minutes) [20].

Enfin, un appareil à impaction centrifuge, comme un impacteur à fente, est censé homogénéiser la répartition des bactéries collectées à la surface du support. Pour ce faire, un rotor au centre de la tête de prélèvement projette les particules de l'air aspiré sur le support de collecte constitué d'une bandelette souple contenant de la gélose [19].

Quelle que soit l'approche choisie, le principal inconvénient de la méthode par impaction réside dans le stress et la fragilisation subis par les bactéries de l'air lors de l'échantillonnage suite au choc sur la surface de collecte et au dessèchement provoqué par le flux balayant la surface du milieu de culture. Bien que ces appareils aient fait l'objet de nombreux travaux et qu'ils présentent l'avantage d'être simples et efficaces, leur champ d'utilisation reste limité. En effet, en ambiance très chargée en microorganismes, les milieux de culture sont fréquemment et rapidement envahis par le développement de flores qui rendent impossible le dénombrement [21]. Parmi les limites énoncées dans la norme AFNOR, on peut aussi noter la faible précision et la nécessité d'un temps d'échantillonnage court. Par contre, le niveau de détection est élevé, ce qui permet une utilisation en atmosphère avec des concentrations faibles en microorganismes [18].

2.3.2. En milieu liquide

Ce type d'impaction, encore appelée « barbotage », repose sur la mise en contact du flux d'air avec un milieu liquide, qui peut être de l'eau, du sérum physiologique, un tampon phosphaté ou parfois même directement un bouillon nutritif. L'air aspiré passe à travers un verre fritté dont la porosité permet d'obtenir des bulles très fines dans le liquide de recueil. Cette technique d'échantillonnage des aérosols dans un fluide a ensuite été améliorée par la mise à profit de l'inertie des particules et on parle alors de biocollecteur par impingement ou d'« impinger » [19]. Cet appareil est très répandu dans le domaine de la métrologie des bioaérosols [14]. Il permet de récolter une plus grande quantité de microorganismes par rapport à l'impacteur classique et, dans certains cas, des prélèvements sur filtres peuvent être remis en suspension et analysés par la suite de la même façon [18].

Bien qu'une perte de liquide se produise durant l'échantillonnage par évaporation ou entraînement de gouttelettes dans le flux d'air, il a été vérifié, à l'aide d'une substance colorante, que ce phénomène n'entraîne pas de modification de la concentration finale mesurée [22].

Toutefois, afin de limiter ces pertes de liquide durant l'échantillonnage, le principe de la centrifugation est utilisé dans les modèles récents d'impingers, ce qui permet de prolonger la durée du prélèvement pendant plusieurs heures. L'air chargé en particules est aspiré par une pompe autonome et pénètre tangentiellement aux parois. Il subit un mouvement tournant avant de ressortir par le haut du dispositif. Les particules subissent ce même mouvement et sont impactées contre la paroi du fait de leur inertie. Cette paroi est constamment lessivée par un écoulement d'eau pendant toute la durée du prélèvement. Celui-ci permet de récupérer les particules collectées par mouvement gravitaire. Il est même parfois proposé d'avoir recours à des liquides non volatils et de forte viscosité pour les prélèvements de longue durée [23].

En terme d'efficacité, elle serait réduite pour les prélèvements de fines particules biologiques, mais cette technique permet des prélèvements dans des atmosphères très contaminées [14].

2.4. La filtration

Le principe de la filtration consiste à faire passer l'air aspiré à travers un filtre de forme membranaire ou fibreuse (comme la fibre de verre par exemple), dont la porosité est choisie de manière à retenir les particules viables. La taille des pores des filtres peut varier de 0,01 à 10 µm (généralement 0,2 à 0,45 µm de diamètre de pore équivalent) [18]. Les membranes peuvent être fabriquées à partir de gélatine, d'acétate de cellulose ou de polycarbonate si l'on souhaite réaliser par la suite une lecture directe en microscopie optique ou électronique. Si l'on souhaite effectuer une analyse, les filtres peuvent être disposés sur un milieu de culture ou être lavés dans un milieu liquide (eau ou bouillon nutritif) pour une remise en suspension des particules et un examen des microorganismes dans la solution de lavage. L'avantage majeur de cette technique est qu'elle permet d'envisager plusieurs types d'analyses visant des agents différents à partir d'un même échantillonnage. Mais elle offre également la possibilité de réaliser des dilutions de la suspension bactérienne obtenue et peut donc être utilisée même dans des ambiances très chargées en microorganismes [24]. Par contre, cette technique n'est guère adaptée aux microorganismes dont les niveaux de concentrations sont très faibles [18].

Les prélèvements peuvent être effectués grâce à un appareil dédié spécifiquement à la collecte des microorganismes des aérosols (biocollecteur à filtration), ou bien il est également envisageable de faire appel à une pompe d'aspiration reliée à des cassettes servant de support aux filtres [19].

L'utilisation de ces appareils est assez simple et leur coût reste relativement faible. Cependant, les filtres, en particulier en gélatine, peuvent être fragiles et le prélèvement est donc impossible dans des ambiances humides (> 75 %) [14]. De plus, cette technique peut stresser là encore les bactéries par assèchement principalement.

2.5. Bilan

De cet inventaire, on ne pourra retenir que deux grandes techniques de prélèvement, qui sont celles par impaction et par filtration, les autres n'étant que très peu employées pour la métrologie des bioaérosols [14].

Pour l'ensemble de ces techniques d'échantillonnage des bioaérosols, la norme AFNOR ne précise pas le type d'appareil à utiliser, mais il est recommandé que l'échantillonneur choisi ait une efficacité d'échantillonnage connue, documentée et que, pour les échantillonneurs physiques, le diamètre aérodynamique des particules recueillies soit défini [18]. De la même manière, pour les pompes, celles-ci doivent satisfaire aux normes sur les pompes pour échantillonnage individuel et échantillonnage à poste fixe (EN 1232, EN 12919).

Les différents appareils de prélèvements présentent très peu d'études sur la qualité au niveau biologique de toutes ces techniques. Toutes les techniques présentées permettent de conserver la viabilité des bactéries collectées. Mais, *a priori*, la qualité du prélèvement dépend surtout du microorganisme recherché et du milieu de collecte. Par contre, la qualité physique de l'échantillonnage est beaucoup mieux renseignée, les efficacités de captage et de collecte pouvant être déterminées à l'aide d'aérosols calibrés [14].

Les travaux destinés à étudier la présence des légionelles dans l'air restent anecdotiques. Ils font généralement appel à des techniques de prélèvement par sédimentation [25], impingement [26] ou impaction en milieu gélosé [27, 28] mais seules ces deux dernières techniques ont jusqu'ici fourni des résultats quantitatifs, la représentativité des résultats obtenus restant à vérifier. La filtration ne semble pas avoir fait l'objet d'applications à la recherche des légionelles.

Comparer les performances des différentes approches de collecte s'avère difficile. Les résultats de comparaisons sont souvent contradictoires. Elles sont principalement

attribuées au fait que vraisemblablement les performances de chacun des procédés de collecte sont dépendantes du contexte environnemental et de l'analyse microbiologique associée. En outre, d'autres recherches de légionelles dans l'air ont échoué dans des ambiances pourtant présumées contaminées. Ces échecs seraient attribués à une concentration trop faible pour être détectée ou au stress lié à la technique de prélèvement. Par contre, dans des expérimentations destinées à étudier la survie ou l'infectiosité des légionelles, des prélèvements en chambre d'aérosolisation ont été analysés avec succès, mais les concentrations générées étaient alors élevées [19]. Pour toutes ces études, l'analyse des échantillons prélevés a été réalisée par culture.

Finalement, de cet inventaire technologique, il ressort que les seules possibilités d'adaptation à notre problématique de mesure des légionelles dans les aérosols sont l'impaction en milieu gélosé ou l'impingement, la filtration n'étant pas utilisable dans des ambiances humides et/ou peu chargées en microorganismes. Toutefois, l'impaction sur milieu gélosé n'assure pas une représentativité de l'échantillonnage et est forcément associée à la méthode d'analyse par culture, contrairement à l'impingement. Cette dernière est donc vraisemblablement la technique présentant le plus de potentialités pour la collecte des bioaérosols de légionelles, puisqu'elle permet par la suite de recourir à différents types d'analyse. Cette conclusion est cohérente avec la littérature, puisque c'est la solution la plus rencontrée dans les travaux consacrés à la métrologie des bioaérosols.

3. MÉTHODES D'ANALYSE DES LÉGIONELLES DE L'AIR

3.1. Introduction

Bien que les légionelles contaminent l'Homme par l'intermédiaire des aérosols infectés, les techniques de détection dans l'air sont peu utilisées et demeurent expérimentales. On a donc recours à diverses techniques d'analyse dans l'eau.

Indépendamment des conditions d'échantillonnage, les méthodes d'analyse utilisées pour les bactéries peuvent conduire à des informations très différentes selon les cas. Cependant, le mode de collecte des particules conditionne en partie les techniques d'analyse à mettre en œuvre : quelle que soit la technique de prélèvement d'air utilisée, l'échantillon se retrouve ensuite sur milieu de culture ou dans l'eau.

Les techniques de culture sur milieu solide sont imposées par une approche de type impaction. Habituellement, l'échantillonnage par impaction recueille les agents sur support solide et, actuellement, seuls des biocollecteurs collectant les agents sur le milieu de culture disposé dans une boîte de Pétri sont commercialisés. La filtration ou le barbotage autorisent l'utilisation de l'ensemble des techniques analytiques disponibles en mesure de micro-organismes dès l'instant où elles ont un seuil de sensibilité suffisant (culture, biologie moléculaire, immunologie ...), chacune de ces méthodes n'ayant pas la même valeur informative.

Pour présenter ces différentes méthodes disponibles, on peut distinguer trois approches de l'analyse des légionelles, à savoir la méthode de référence par culture, les méthodes dites « cellulaires », pour lesquelles l'activité cellulaire est maintenue et permet la détection bactérienne, et enfin, par opposition, les méthodes dites « destructives ».

3.2. Méthode de référence

La méthode de référence pour la détection des légionelles dans l'eau est la méthode par mise en culture sur des milieux nutritifs, décrite par la norme AFNOR NF T90-431, datant de 1993 mais actualisée le 20 novembre 2003 [12]. C'est la seule reconnue et agréée par les autorités sanitaires françaises. En parallèle, il existe une autre méthode normalisée pour la recherche de légionelles dans l'eau établie par l'ISO (ISO 11 731 : Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement des *Legionella*). Cette dernière est également basée sur la culture [2]. La révision de la norme AFNOR de 2003 intègre des

techniques mentionnées dans la norme ISO, afin d'étendre son champ d'application aux eaux troubles.

La découverte tardive de la bactérie *Legionella* est due à la difficulté de la cultiver, alors que les maladies dues à cet agent pathogène sont connues depuis longtemps. Le paradoxe entre l'abondance des légionelles dans l'environnement et la difficulté de culture in vitro s'explique, selon certains auteurs, par son développement naturel à l'intérieur de protozoaires qui sont absents des milieux de culture [13]. La mise en culture de *Legionella* requiert par conséquent des conditions très spécifiques précisées dans cette norme.

Le prélèvement peut normalement concerner des eaux propres ou sales. Le volume de prélèvement est de 1 litre et on utilise un récipient stérile avec, si nécessaire, du thiosulfate de sodium pour neutraliser les oxydants. L'échantillon peut se conserver au maximum 48 heures à 5 ± 3 °C et l'ensemencement doit s'effectuer au plus tard le surlendemain. Les conditions de prélèvement, de transport et le délai de traitement de l'échantillon doivent être rigoureux et reproductibles.

Initialement, la norme préconisait une filtration de l'échantillon, suivie d'un traitement thermique ou d'un traitement à pH acide. Ce protocole se trouvait faussé en raison de la mauvaise qualité de l'eau des échantillons et du problème de colmatage des filtres. Depuis les modifications de novembre 2003, une centrifugation remplace la filtration et il est demandé de pratiquer un double traitement, à la fois thermique et acide, sur un même échantillon, l'intérêt étant d'éviter l'utilisation de filtres et de contrecarrer la présence de flores envahissantes dans les eaux « sales », comme les eaux de tours aérorefrigérantes par exemple.

Ensuite, la mise en culture sur un milieu gélosé spécifique peut se faire soit par ensemencement direct, soit par ensemencement après concentration. Les géloses sont incubées et le résultat final est obtenu en 8 à 10 jours. Les conditions d'incubation utilisées (température, composition du milieu de culture) sont choisies en fonction de l'espèce recherchée. Les milieux de culture normalement utilisés pour *Legionella* sont le milieu de croissance BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) Agar Medium et le milieu sélectif GVPC à base de BCYE supplémenté en glycine et avec 3 antibiotiques (vancomycine, polymyxine et cycloheximide) [29]. Toutefois, le milieu spécifique BCYE est le plus largement utilisé, bien que sa sensibilité puisse s'avérer limitée par la surcroissance ou l'inhibition par des cellules accompagnatrices [14]. Il a pour principale caractéristique la présence de charbon actif (détoxifiant), de fer et de L-cystéine.

Pour améliorer l'isolement des *Legionella*, il est possible d'avoir recours à des prétraitements sélectifs, qui mettent l'accent sur des spécificités de leur écologie, comme la résistance aux pH faibles et aux fortes températures.

Ensuite, la multiplication des agents collectés donne naissance à des colonies qui peuvent être dénombrées [19]. Mais une durée de 10 jours incompressible est nécessaire à l'obtention des résultats définitifs. Ces résultats sont exploitables si le nombre de colonies par boîte, est au moins égal à 5. L'identification des souches au niveau de l'espèce et du séro groupe se fait ensuite à partir de tests biochimiques ou immunologiques spécifiques, soit par immunofluorescence de l'espèce *Legionella pneumophila* (NF XPT 90-431), soit par agglutination des souches avec des particules de latex (NF T90-431).

Dans les eaux propres, le CSHPF [11] considère que la limite de détection de cette méthode peut descendre jusqu'à 50-100 UFC / L, mais ce seuil pourrait atteindre 250 UFC / L dans des eaux « brutes » de type eaux de rivière ou eaux des bassins d'aérorefrigérants d'après Matthieu Le Brun (communication personnelle) du Laboratoire National d'Hydraulique et d'Environnement (EDF, Recherche et Développement). La limite de quantification est une notion difficile à définir pour des méthodes de mesures microbiologiques, elle est généralement considérée à 250 UFC/L. Pour simplifier, il est donc admis de l'assimiler à la limite de détection.

En effet, celui-ci ne donne qu'une estimation du nombre de bactéries cultivables présentes dans l'échantillon. Or, la viabilité d'une bactérie a longtemps été associée à sa cultivabilité, mais des études de microbiologie environnementale ont mis en évidence des Bactéries Viables mais Non Cultivables (BVNC) [30]. Toutes les bactéries prélevées dans un milieu ne sont pas aptes à se reproduire et à constituer des colonies. Les bactéries mortes ou dans un état physiologique altéré ne seront notamment pas dénombrées par cette technique et le résultat obtenu correspond donc plus à une concentration en bactéries cultivables dans les conditions de la norme qu'à un dénombrement complet de toutes les bactéries présentes dans l'échantillon prélevé. De ce fait, les résultats obtenus par les différentes méthodes de dénombrement bactérien peuvent diverger. Cet état BVNC pose un réel problème car il est difficile d'accéder au nombre de bactéries vivantes et mortes. Des recherches sont donc poursuivies sur la mise au point de méthodes susceptibles de palier à ce problème.

Selon l'Association Ecomicth [30], des essais entre laboratoires (Réseau d'intercalibration AGLAE) ont été réalisés montrant les avantages et limites des méthodes d'analyses microbiologiques et physico-chimiques et, notamment, mettant en évidence la variabilité d'un logarithme sur les dénombrements des légionelles selon la méthode AFNOR.

Cependant la culture reste la méthode la plus utilisée, notamment parce qu'elle permet l'identification de l'agent, et c'est sur elle que repose à ce jour l'essentiel des publications scientifiques sur la contamination bactérienne de l'air. Par analogie avec les observations faites sur l'eau, cette technique peut être appliquée à des prélèvements d'air peu chargés en microorganismes, alors qu'autrement on retrouve le problème des flores parasites sur le milieu de culture. En rapportant le résultat du dénombrement au volume d'air prélevé, on obtient une estimation de la concentration en bactéries cultivables de l'air qui s'exprime en Unités Formant Colonies par mètre cube (UFC / m³).

3.3. Techniques cellulaires

En se basant sur la cellule elle-même, les techniques dites « cellulaires » peuvent permettre, suivant les cas, une identification des légionelles jusqu'à l'espèce ou la sous-espèce en termes de nombre de cellules pour un volume donné d'échantillon.

L'observation microscopique directe s'est en effet enrichie de nouvelles techniques [3]. Ainsi, l'utilisation d'anticorps marqués par des agents fluorescents, l'utilisation de sondes génétiques et de la cytométrie permet le comptage et l'identification rapide des microorganismes. Ces techniques apportent de la spécificité par rapport à l'analyse microscopique directe. De plus, un couplage est généralement possible avec un critère de viabilité selon la technique. Le résultat obtenu est quantitatif et, en principe, dès lors qu'une cellule bactérienne est présente dans l'échantillon, elle est détectée et quantifiée.

3.3.1. Dénombrement direct

Le dénombrement direct peut être utilisé pour déterminer le nombre de cellules bactériennes totales dans les échantillons grâce à plusieurs techniques pouvant faire appel à un marquage des cellules (immunologique, génétique) ou à des procédés d'analyse d'images. Le résultat obtenu s'exprime par une concentration en nombre de cellules bactériennes par m³ d'air, viables ou totales selon les cas.

Tout d'abord, la microscopie électronique est la première de ces techniques proposées pour le dénombrement direct des microorganismes de l'air [19].

Ensuite, l'observation microscopique utilisant des colorants fluorescents pour améliorer la visibilité est possible. Par exemple, le dénombrement direct par microscopie en épifluorescence repose sur un marquage de l'ADN (Acide DésoxériboNucléique) bactérien par des fluorochromes après filtration de l'échantillon liquide sur membrane de polycarbonate à fond sombre. Puis, la détection et le comptage peuvent se faire par fluorescence au moyen d'un système d'analyse d'images [14]. D'une part, le marquage

peut être indépendant de l'état physiologique de la cellule et il permet dans ce cas de dénombrer en microscopie à épifluorescence la totalité des cellules, vivantes ou mortes. Le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) qui se fixe sur l'ADN peut par exemple être utilisé comme fluorochrome de ce type [31]. D'autre part, il est possible de cibler différents composants cellulaires, le plus souvent sont visées des structures traduisant l'activité métabolique de la cellule donc sa viabilité. Ainsi, le dénombrement intègre les cellules vivantes même si elles ne sont pas cultivables. L'acridine orange est un marqueur des acides nucléiques qui est utilisé pour les bactéries de l'air [32]. On peut également procéder à des dilutions ce qui n'est pas possible avec la culture directe. Les résultats sont finalement exprimés en cellules bactériennes par m³ d'air prélevé.

Enfin, le dénombrement direct des bactéries peut se faire par cytométrie de flux, mais très peu de travaux y font appel dans le cadre de l'étude de la contamination de l'air. Cette technique permet de caractériser les cellules d'un point de vue morphologique et de distinguer les cellules viables ou non par l'intermédiaire d'un marquage [33]. Ses autres avantages sont une automatisation possible et une discrimination objective des bioaérosols de débris inorganiques par des analyses multiparamétrées, mais elle est freinée par un coût élevé.

De manière générale, on trouve encore peu de travaux utilisant l'ensemble de ces techniques dans le domaine de la contamination de l'air. Leur intérêt reste en effet limité du fait qu'elles n'offrent qu'une caractérisation morphologique et non une identification précise. De toute façon, il ne s'agit pas ici d'une analyse spécifique des légionelles. Se pose par ailleurs le problème du dénombrement des particules groupées en amas et des auteurs ont pu noter un rapport de 1 à 1 000 entre les concentrations obtenues par techniques de culture et les dénombrements totaux [32].

3.3.2. Approche de type immunologique

Les méthodes proposées consistent à utiliser des anticorps couplés à un système de détection (technique de dénombrement direct), afin de rechercher des antigènes spécifiques de la légionelle et la mettre ainsi en évidence. La liaison antigène/anticorps peut être visualisée par des marqueurs radioactifs, enzymatiques ou fluorescents le plus souvent.

L'application de ces techniques immunologiques aux bactéries de l'air reste très marginale [19]. Cependant, des méthodes visant à détecter l'activité enzymatique des agents ont par exemple été utilisées pour étudier les spores d'actinomycètes dans l'air [34]. Un deuxième anticorps lié à une enzyme est alors utilisé pour la détection. L'ensemble anticorps-enzyme vient se fixer sur l'antigène. Puis, l'enzyme fixée, mise en présence de son substrat, catalyse une réaction, dont le suivi permet de connaître la quantité d'antigène retenu et présent dans l'échantillon initial [3]. La lecture est ensuite effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre. La technique dite « ELISA » fait partie de ces techniques cellulaires de type immunologique, utilisant un système de puits avec des dilutions croissantes et offrant ainsi une meilleure détection. Mais elles ne sont pas à ce jour utilisées en routine pour des bactéries comme les légionelles.

Selon Matthieu Le Brun (communication personnelle), ce type de technique est facile d'emploi et spécifique quasiment à 100 % une fois l'anticorps produit. Mais la production des anticorps est toujours très coûteuse.

La limite de détection de ce type de technique ne peut être estimée puisqu'elle dépend directement du volume de l'échantillon analysé. Un autre aspect limitant est le risque d'interférences à cause d'une mauvaise qualité de l'échantillon, puisqu'il peut devenir délicat de distinguer les légionelles du bruit de fond général (certaines bactéries possédant une fluorescence naturelle).

Enfin, ce type de technique permet la reconnaissance de cellules vivantes et de cellules mortes présentant toujours leur intégrité cellulaire, à condition de disposer pour cela des marqueurs appropriés. Si l'on souhaite avoir une information supplémentaire et distinguer

les cellules vivantes, autrement dit, qui manifestent une activité métabolique, il est alors nécessaire de coupler la technique à un test de viabilité, basé sur la reconnaissance de la respiration cellulaire par exemple.

Toutefois, les résultats obtenus de cette manière ne sont pas directement corrélables avec ceux donnés par la mise en culture, puisque la question de la signification de la viabilité se pose à nouveau ici, la viabilité impliquant l'activité métabolique mais pas forcément la possibilité de développement en culture.

3.3.3. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire sont une alternative aux méthodes classiques précédentes pour contrôler spécifiquement des légionelles dans des échantillons de l'environnement. Ces méthodes de mesure non destructives, qui reposent sur la détection dans le matériel biologique du germe recherché d'un marqueur spécifique (génétique), permettent une reconnaissance tout en maintenant la structure cellulaire des germes recherchés. Il s'agit de méthodes de détection cellulaire principalement. Le résultat est alors exprimé en nombre de cellules par m³ quelle que soit la technique.

3.3.3.1. La méthode FISH (« Fluorescent In Situ Hybridization »)

La technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) permet l'examen de séquences d'acides nucléiques à l'intérieur des cellules bactériennes sans altérer leur morphologie ou l'intégrité des différents compartiments, pour la détection et la caractérisation phylogénétique des bactéries par microscopie.

L'hybridation *in situ* peut se baser sur l'ADN du noyau bactérien ou sur l'ARN (Acide RiboNucléique) messenger, qui assure le rôle de transfert de l'information génétique de l'ADN vers la cellule et entraîne la production de protéines après traduction du message par les ribosomes.

Cependant, l'ADN nécessite des manipulations supplémentaires relativement lourdes par rapport à l'ARN (séparation des deux brins), c'est pourquoi il présente moins d'intérêt pour cette technique en dépit de sa stabilité supérieure. Généralement sont donc utilisées des sondes d'acides nucléiques spécifiques de l'ARN ribosomal des bactéries marquées par un fluorochrome [33]. Le principe consiste à faire pénétrer cette sonde dans la cellule après traitement. La technique d'hybridation *in situ* a alors pour but de localiser une séquence particulière de l'acide nucléique (cible) au sein de la cellule (*in situ*) par association (hybridation) avec une sonde oligonucléotidique de séquence complémentaire. La sonde est marquée avec un fluorochrome permettant ainsi sa détection au microscope à épifluorescence. Les légionelles peuvent ainsi être dénombrées en microscopie à fluorescence ou cytométrie de flux, mais l'automatisation est difficile à mettre en place. Les progrès réalisés ces dix dernières années sur la sensibilité et la rapidité de cette technique ont fait de FISH un outil intéressant pour les études environnementales en microbiologie, notamment dans le cas des légionelles.

D'après Matthieu Le Brun (communication personnelle), les ARN messagers (ARN_m) sont spécifiques d'un genre, d'une espèce ou même d'une sous-espèce dans le cas de l'ARN dit 16S, considéré comme le support de la classification des espèces dans l'arbre phylogénétique de l'ensemble des souches microbiennes, c'est pourquoi ils sont généralement choisis comme cible. Le gène d'ARNr 16S, qui existe en multiples copies par génome, augmente ainsi la sensibilité de détection des méthodes de biologie moléculaire [35]. Concernant le critère de viabilité, il peut être recherché l'expression d'ARN_m (spécifique ou non), auquel cas le niveau d'expression doit être suffisamment important pour être détecté. Dans l'environnement, le niveau d'expression est en général faible et ne permet pas ce type d'approche. Toutefois, l'ARN messenger présente une durée de vie assez courte. Si on veut disposer d'un test de viabilité fiable, il faut être donc capable d'hybrider rapidement un échantillon. Le critère de viabilité peut aussi être recherché en mesurant l'expression d'une activité enzymatique plus ou moins spécifique des germes recherchés. Cela implique que l'activité mesurée ait un temps de

renouvellement court et que le niveau d'activité soit suffisamment important pour être détecté. Enfin le protocole de détection et le protocole de viabilité doivent être compatibles ce qui n'est pas obligatoire.

En outre, les bactéries contiennent des quantités importantes de ribosomes qui sont autant de sites de fixation pour les sondes et qui permettent ainsi d'avoir un signal suffisamment puissant pour visualiser les bactéries au microscope. Cependant, l'intensité de la fluorescence dépendant de la quantité de cibles dans les cellules, il est possible, comme toute autre méthode mesurant une activité métabolique, d'être sous le seuil de détection notamment pour certaines bactéries contenant peu de ribosomes. De ce fait, l'intérêt de cette technique dans l'étude de la contamination de l'air pourrait s'avérer limité du fait de la corrélation entre la quantité d'ARN et l'état de la cellule. En effet, les bactéries lésées, que l'on rencontre dans l'air, peuvent être métaboliquement peu actives, ce qui limite l'importance de l'ARN ribosomal et donc les possibilités de fixation de la sonde. Certaines bactéries ne seraient donc pas détectées par insuffisance de marquage [19]. Il existe des techniques de recharge énergétique pour pallier ce problème, mais elles demeurent très lourdes donc rarement utilisées.

Cependant, cette technique FISH reste un exemple de ces nouvelles méthodes de détection qui peuvent être appliquées à l'analyse des bactéries dans des échantillons provenant de l'air. Elle est actuellement la plus recommandée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité vis-à-vis des légionelles, parmi les plus importantes que l'on puisse espérer à l'heure actuelle.

3.3.3.2. La cytométrie à balayage laser en phase solide

Cette nouvelle technique permet un dénombrement rapide et sensible (10 à 100 bactéries par litre) de *Legionella* dans l'eau des systèmes d'eau chaude sanitaire. Elle a été mise au point et présentée en début d'année 2004 par Helena Aurell dans le cadre de sa thèse au sein de l'école doctorale E2M2 de l'Université Claude Bernard (Lyon 1) [36].

La détection et l'énumération des *Legionella pneumophila* par cytométrie à balayage laser en phase solide est réalisée en trois étapes. Tout d'abord, les cellules contenues dans l'échantillon sont concentrées par filtration sur une membrane de 25 µm. Ensuite, ces cellules sont marquées par un anticorps de surface couplé avec un fluorochrome. Enfin, leur membrane est analysée à l'aide du cytomètre ChemScan RDI (Chemunex). Suite à cette analyse, chaque événement (signal) détecté peut être visualisé et validé grâce à un microscope à épifluorescence équipé d'une platine motorisée pilotée par le système informatique du ChemScan. La platine déplace la membrane sur son support de telle sorte que l'événement sélectionné se retrouve sous l'objectif au centre du champ microscopique. Dans ce cas, l'appareil intervient en complément du microscope, ce qui permet de valider *de visu* les résultats du ChemScan. La durée de l'analyse augmente avec le nombre d'évènements sur la membrane.

L'inconvénient de cette méthode très récente, non encore validée officiellement, réside dans sa limitation aux eaux « propres », elle ne peut en effet pas être appliquée aux eaux brutes du type de celles des tours aéroréfrigérantes. De la même manière, il est donc nécessaire de se limiter aux échantillons d'air provenant d'ambiances peu chargées. Cette technique ne permet pas non plus une énumération des agents présents au regard de la viabilité (une étude de faisabilité est en cours).

3.4. Techniques destructives

Il s'agit uniquement de techniques de biologie moléculaire. Elles nécessitent un délai de quelques heures à 10 jours pour obtenir le résultat suivant la technique. Il en existe un certain nombre, se distinguant selon deux aspects. D'une part, la première catégorie de techniques (AFLP, KAPD, RFLP, etc) permet, pour certaines espèces, le typage avec objectif d'identification de la souche de légionelles grâce à des profils d'électrophorèse. Elles sont utilisées afin d'obtenir un historique des souches épidémiques et d'enregistrer

de nouveaux profils. Au Centre National de Référence des Légionelles à Lyon, le typage moléculaire avec l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) permet d'identifier une source de contamination de manière la plus discriminante [37]. D'autre part, les autres techniques ont un aspect quantitatif avec amplification génique, dont la plus connue est la méthode PCR (« Polymerase Chain Reaction »). D'autres méthodes, similaires dans leur principe, existent ; il s'agit des méthodes de ligation en chaîne (la LCR : Ligase Chain Reaction) ou celle utilisant la Q β réplicase.

La PCR se fonde sur la propriété de l'ADN intact d'une seule cellule de permettre, après amplification, l'identification de l'espèce correspondante. On distingue deux techniques de PCR, l'une sur phase solide (SP-PCR), et l'autre avec concentration sur filtre, la dernière étant moins adaptée à notre problématique. Cette dernière peut permettre le contrôle de plusieurs microorganismes dans un simple échantillon, puisqu'une fois l'acide nucléique immobilisé dans un filtre, plusieurs réactions d'amplification peuvent être menées sur la même membrane [14]. Elle est aussi plus couramment utilisée dans la métrologie des microorganismes aéroportés et en particulier des légionelles. La recherche et la quantification des *Legionella* par PCR s'effectuent en quatre phases [38] :

1. Concentration par filtration sur membrane de porosité nominale 0,45 μ m
2. Extraction des acides nucléiques par lyse cellulaire et purification
3. Amplification en chaîne de séquences spécifiques d'acide nucléique appartenant au genre *Legionella* ou à l'espèce *Legionella pneumophila* jusqu'à ce qu'elle puisse être détectée grâce à une sonde avec fluorochrome
4. Identification et quantification des amplicons.

Les étapes préalables de développement de tests PCR passent par l'optimisation des paramètres d'amplification (nombre de cycles, température d'hybridation...) et de la composition du mélange réactionnel (amorces, tampon, MgCl₂, sondes...).

Ainsi, il est possible de déceler des bactéries à des concentrations plus faibles qu'avec les techniques de culture classiques, puisque la simple présence de matériel génétique suffit. La limite de détection est donc inférieure à 50 UFC/L. Suivant l'appareillage, elle correspond au plus petit nombre de copies de génome détectable avec un risque de non-détection de 10 % [38]. La réponse obtenue est par ailleurs bien plus rapide. L'étude d'Alvarez *et al.* montre en effet que la méthode PCR pour la détection de microorganismes aéroportés est rapide et sensible [39]. Elle pourrait donc être utilisée comme une méthode alternative pour le contrôle de la qualité de l'air. Elle peut en effet être utile pour la détection de microorganismes aéroportés qui ne peuvent être cultivés suite au stress causé par l'échantillonnage ou l'aérosolisation [14]. Pourtant, ces techniques sont encore peu développées dans l'étude de la contamination de l'air du fait qu'elles ne fournissent qu'un résultat qualitatif [19].

Néanmoins, le développement des méthodes PCR en temps réel (« Real time quantitative PCR ») permet désormais de dénombrer les fragments génétiques de bactéries de l'échantillon. L'analyse pourrait concerner l'ensemble des bactéries présentes ou seulement des agents d'intérêt selon la cible choisie : séquence d'ADN ou d'ARN spécifique d'un genre, d'une espèce ou d'une souche. En ciblant certaines séquences d'acides nucléiques codant pour des facteurs de pathogénicité (comme le gène MIP directement impliqué dans le processus pathogène [38]), ces méthodes de biologie moléculaire offriraient aussi la possibilité de pouvoir distinguer, parmi les différentes souches d'une même espèce, celles qui sont susceptibles d'exercer un effet délétère [40].

Parmi les limites de la PCR, on retient qu'elle génère de faux positifs à travers la détection d'acides nucléiques nus, de microorganismes non viables [14]. En effet, ces techniques de PCR très sensibles, qui permettent de descendre la limite de détection à quelques fragments d'ADN, ne donnent qu'un résultat en nombre de copies d'ADN (Unités Génome/L) et non en nombre de cellules. Globalement, les méthodes type PCR sont moins précises que les approches non destructives car elles nécessitent une excellente performance de l'opération de récupération du matériel génétique puis une réaction

stœchiométrique entre le signal PCR et le nombre de cellules lysées. Actuellement, la proportionnalité entre le signal PCR et le nombre de cellules est reconnue mais ne permet pas de quantifier précisément. Ce sont donc, pour la plupart, des méthodes semi-quantitatives. Ce résultat ne peut pas être mis en corrélation avec les résultats de la mise en culture ou les résultats en nombre de cellules bactériennes. D'ailleurs, il n'est pas possible de savoir concrètement à quoi correspond le résultat donné par la PCR, ni de savoir de combien de cellules de départ proviennent les fragments d'ADN détectés. En effet, le lien entre le nombre de copies d'ADN et le nombre de cellules correspondantes est inconnu. La détection d'une présence de matériel génétique ne signifie pas pour autant présence de bactéries viables infectieuses. Cette technique permet donc de détecter des fragments d'ADN de légionelles, ce qui ne correspond pas forcément à une bactérie viable et virulente proprement dite.

Inversement, ces techniques destructives ont l'avantage d'offrir une très grande spécificité de détection lorsque l'on dispose d'une séquence cible. Selon Matthieu Le Brun (communication personnelle), leur niveau de spécificité est supérieur à celui de toutes les autres techniques qui ont été vues précédemment, moyennant toutefois de lourdes capacités en matériel et en formation de personnel. Cette technique PCR a été choisie par l'AFNOR pour la future norme de détection des légionelles et est actuellement en voie de normalisation [38]. Elle ne peut par ailleurs pas fournir d'indications sur la viabilité des souches. Pour les méthodes destructives, la seule façon actuellement de montrer que des cellules manifestent une activité métabolique est de rechercher l'expression d'un gène via la détection d'ARNt (Acide Ribonucléique de transfert) ou d'ARNm (Acide Ribonucléique messager). Dans ce cas, il s'agit de RT-PCR (Retro -Transcriptase PCR). Son utilisation actuelle se limite donc encore cependant à une complémentarité par rapport à l'analyse réglementaire. Elle n'est qu'au stade de développement et ne peut donc pas être appliquée en routine.

3.5. Bilan

Au vu de cet inventaire technique, il ressort que les méthodes les plus récentes faisant appel à la biologie moléculaire, qu'elles soient cellulaires ou destructives, s'avèrent être les plus efficaces en matière de recherche de légionelles, et ce grâce à leurs performances en termes de sensibilité et de spécificité, en particulier concernant la technique FISH, qui semble la seule à offrir un résultat réellement quantitatif. Dans le domaine environnemental, l'intérêt des techniques destructives ou non destructives est souvent limité par la présence d'éléments dans la matrice qui peuvent soit directement interférer avec la détection soit constituer un bruit de fond suffisamment important pour occulter le signal de détection. Par ailleurs, elles peuvent également être inhibées par des contaminants environnementaux [14].

La méthode normalisée ne semble pas pour autant adaptée aux mesures environnementales, que ce soit lorsque les échantillons proviennent d'eaux brutes ou d'atmosphères chargées, où des flores interférentes peuvent gêner le dénombrement dans les échantillons ou bien, au contraire, lorsque les concentrations en légionelles dans les échantillons sont trop faibles et restent inférieures à la limite de détection de la méthode. Mais toutes les autres méthodes dites rapides ne permettent pas non plus actuellement de travailler sur des échantillons chargés.

D'ailleurs, pour ce qui est des performances des méthodes d'analyse de légionelles sur les échantillons environnementaux, Palmer *et al.* (1995) ont recherché des légionelles dans l'air au-dessus d'un bassin de station d'épuration et ont alors expérimenté plusieurs techniques d'analyse [26]. Les résultats que ces auteurs ont obtenus sont en faveur de l'utilisation des méthodes de biologie moléculaire par PCR puisqu'elles ont permis d'observer quatre échantillons positifs sur neuf, contre trois sur neuf par des techniques immunologiques et seulement deux sur neuf par culture.

De la même manière, Medema *et al.* (2002) ont cherché à estimer l'exposition des travailleurs aux *Legionella* par les aérosols dans des stations d'épuration d'eaux usées [41]. La présence de *Legionella* de toutes espèces (*sp*) et de *pneumophila* en particulier dans des échantillons d'eau et d'air provenant de différentes installations de traitement a été déterminée par culture, immunofluorescence directe et PCR. Des *Legionella* ont ainsi été détectées dans tous les échantillons d'eau avec la PCR, mais pas avec la méthode de culture, qui s'est trouvée gênée par la présence d'autres bactéries interférentes. L'immunofluorescence a été également entravée par les autres flores présentes dans les échantillons. Des *Legionella sp* et *Legionella pneumophila* ont aussi été détectées dans des échantillons d'air prélevés grâce à un biocollecteur par impaction sur milieu gélosé suivi d'une remise en suspension dans de l'eau stérile, alors que rien n'était visible par la culture. Ces résultats confirment donc l'intérêt de multiplier les méthodes d'analyse pour un même échantillon et de compléter la méthode de culture par des méthodes détectant des bactéries non cultivables comme la PCR. Ils confirment par ailleurs qu'il pourrait y avoir eu perte de cultivabilité de ces bactéries suite à l'aérosolisation ou au prélèvement.

Aujourd'hui, les techniques de biologie moléculaire (PCR) et d'immunofluorescence sont reconnues et habituellement appliquées pour l'identification des souches de *Legionella* isolées en culture. Toutefois, leur utilisation pour la détection et la quantification des *Legionella* dans les échantillons de l'environnement (eau, air) n'est pas recommandée, les données expérimentales n'étant pas toujours fiables [12]. D'ailleurs, des limitations ont été apportées dans l'utilisation de ces techniques de biologie moléculaire, concernant l'existence possible d'une part de substances interférentes dans l'air [19] et d'autre part d'inhibiteurs de l'amplification [42].

Cependant, un groupe d'étude a été créé par l'AFNOR en 2001 sur les méthodes rapides. La PCR a été choisie et fait l'objet d'un projet de norme AFNOR (T90 EN 13). Elle ne se substituerait pas à la méthode de référence, mais serait développée pour un suivi complémentaire.

Dans la métrologie de l'aérobiocontamination, on retiendra que l'analyse est effectuée sur un échantillon d'eau provenant à l'origine de l'air. Les incertitudes sur l'analyse sont les mêmes que pour les échantillons provenant d'eaux prélevées.

Il faut donc distinguer l'aspect prélèvement de l'air, dont la qualité dépend de la technique utilisée, de l'aspect analyse des légionelles, où l'on détecte ce qu'il y a dans le milieu avec une qualité dépendant de celle du prélèvement préalable : il y a donc bien déjà d'emblée deux niveaux d'incertitude dans la métrologie des aérosols. Il est donc justifié de se demander si le résultat en termes de concentration en légionelles est toujours représentatif du milieu atmosphérique d'origine.

4. CONCLUSION

A l'heure actuelle, aucune technique disponible sur le marché pour l'échantillonnage ou l'analyse des bactéries de l'air ne permet de collecter, d'identifier et de dénombrer avec certitude tous les agents présents. Même avec une méthode d'échantillonnage fiable, chaque technique présentée précédemment est susceptible de léser certains agents et ainsi de sous-estimer leur concentration, voire même de ne pas détecter leur présence. Quand on souhaite étudier la composition de bioaérosols, il est donc recommandé de mettre en œuvre simultanément plusieurs techniques d'analyse différentes et de mettre en balance leurs résultats respectifs avec la seule méthode de référence, qu'est la mise en culture. Par conséquent, on comprend l'intérêt d'opter pour une technologie de prélèvement comme celle de l'impinger, non seulement une des plus fiables à l'heure actuelle, mais qui, de surcroît, permet matériellement d'avoir des échantillons sous une forme compatible avec tous les types d'analyse.

Le choix d'une méthode d'identification ou de quantification dépend non seulement du mode de recueil de l'échantillon, mais aussi de l'état attendu du microorganisme.

Or, le problème récurrent qui se pose encore ici est celui de la viabilité de la bactérie. Les microorganismes viables sont des organismes vivants qui ont la capacité de se reproduire et qui ont donc un potentiel d'activité métabolique. Ils sont soit cultivables, soit non cultivables. En effet, certaines Bactéries Viables mais Non Cultivables (BVNC), bien qu'elles présentent une activité métabolique, ne semblent pas pour autant avoir la capacité de division cellulaire nécessaire au développement en culture. Un microorganisme peut être non viable et non cultivable, il est dans ce cas mort [18]. A l'heure actuelle, il n'est pas scientifiquement possible d'expliquer l'origine de ce phénomène (stress des bactéries ou entrée dans un processus de dormance empêchant la culture ?), ni d'affirmer si ces BVNC sont pathogènes ou non. Les liens viabilité/cultivabilité et cultivabilité/pathogénicité se sont pas encore connus actuellement. Cette notion de BVNC est reconnue, elle fait référence à un concept selon lequel les microorganismes perdent de façon réversible leur faculté à être cultivés. Mais elle est très discutée par les experts, qui ne retiennent pas tous les mêmes critères de classification. Il est donc intéressant dans le cadre du mesurage des légionelles d'avoir un aspect viabilité dans les résultats, mais il faut savoir que le lien avec les résultats en termes de cultivabilité n'est pas évident.

Les résultats obtenus par l'ensemble des techniques d'analyse non normalisées, cellulaires ou destructives, ne sont pas corrélables avec ceux de la mise en culture. Aussi, les résultats des méthodes destructives ne sont pas à mettre en corrélation non plus avec ceux des techniques cellulaires. Par conséquent, on comprend l'intérêt de pratiquer en parallèle plusieurs types d'analyse différents, afin d'avoir plusieurs points de vue dans l'optique d'une interprétation sanitaire des données. Il faut donc se limiter à une simple comparaison de ces résultats entre eux, puisque les informations en termes d'abondance et de viabilité des légionelles ne sont pas les mêmes. Ils n'ont donc pas la même signification sur le plan sanitaire, d'autant plus qu'on ne sait toujours pas actuellement quels sont les critères de pathogénicité des légionelles.

Enfin, aucune des méthodes de recherche de légionelles ne permet la détection de la virulence des bactéries. Aucun marqueur moléculaire de virulence chez les légionelles, permettant d'être sûr de la virulence d'une espèce, n'est actuellement ni connu, ni isolé. Le plus souvent, les techniques présentées sont mobilisées en vue d'enquêtes épidémiologiques, c'est-à-dire qu'*a posteriori*, une fois une souche isolée à la fois chez le malade et dans l'environnement, on conclut à la virulence de la souche incriminée. Mais toutes les bactéries d'une même sous-espèce ne sont pas forcément virulentes de la même manière. Cet aspect est donc à prendre en compte quand on cherche à estimer l'exposition des populations dans le cadre d'une évaluation du risque de légionellose. La virulence dépend à la fois de l'espèce et de l'écologie.

Avant d'aborder les aspects pratiques concernant les mesures de concentration en légionelles dans les aérosols issus des centrales électriques, cette étude bibliographique a permis de rappeler quelles sont les techniques utilisées pour l'échantillonnage de l'air et pour la recherche des légionelles. Celle-ci montre qu'il peut exister une grande variabilité des résultats selon les appareils de prélèvement et les méthodes d'identification utilisés, et il doit en être tenu compte dans l'interprétation et la comparaison des données.

PARTIE 3

Méthodologie d'approche pratique de l'estimation de la contamination en légionelles autour d'aéroréfrigérants :

Exemple de démarches faisant appel à la métrologie des aérosols

1. PRÉLIMINAIRES

En prélude de cette présentation de plusieurs approches pratiques, il convient de rappeler que, dans la démarche d'évaluation de l'exposition aux légionelles, il faut disposer de la contamination de l'air sur le lieu d'exposition d'où l'utilité de mesures dans les aérosols.

Cependant, l'exposition humaine n'est pas toujours accessible à la mesure pour des raisons pratiques, techniques, financières. Pour pallier ces inconvénients, il est donc courant de combiner des mesures effectuées sur le terrain à des estimations ayant pour origine possible, la modélisation [43]. Les phénomènes de transfert de la particule depuis le milieu-source vers les autres médias sont traduits sous forme de fonctions mathématiques. A partir de mesures de concentrations par exemple, dans le milieu initialement pollué (le terme source), le modèle estime les concentrations attendues en d'autres lieux géographiques.

Dans notre cas, les modèles utilisés ont pour objet de traduire la manière dont les concentrations en légionelles peuvent varier dans le temps et dans l'espace, et la façon dont les conditions environnementales interviennent sur ces modifications. L'exposition est alors quantifiée en combinant les résultats de mesures dans l'eau et à des estimations obtenues par modélisation des phénomènes de transfert des polluants de la source vers la population exposée.

Cette démarche était jusqu'à présent la seule utilisable pour notre problématique. En effet, jusque-là, à défaut de mesures dans l'air, le SEM basait son évaluation de risque sur une approche par modélisation avec utilisation de calculs de dispersion du panache à partir de la concentration mesurée dans l'eau des circuits. Cette méthode a donné lieu à un exercice méthodologique sur le site de Chinon notamment.

Aujourd'hui, après un inventaire théorique des techniques disponibles pour notre problématique en matière de prélèvement d'air et de mesures des légionelles, on a maintenant un exemple concret de ce qui a été fait pour un épisode réel investigué, grâce aux premières mesures d'aérosols réalisées par le CSTB (Centre Scientifique et Technique du Bâtiment) lors de l'épidémie du Pas-de-Calais. Ainsi, ce qui a été fait autour de l'usine Noroxo en termes de métrologie pourrait ainsi s'avérer une autre approche pour l'évaluation du risque de légionellose conduite par le SEM. En effet, cette campagne de mesures sur site a mis en œuvre les techniques adaptées aux légionelles mises en évidence dans l'étude bibliographique.

On dispose désormais de deux exemples d'applications pratiques de l'évaluation de l'aérobiocontamination : modélisation de la dispersion des panaches issus des tours calée sur la concentration dans l'eau et mesure dans les aérosols.

Dans cette partie pratique du mémoire, on verra tout d'abord la démarche actuelle d'EDF pour l'estimation des expositions par modélisation, suivie de la démarche exploratoire de mesures d'aérosols par le CSTB exploitable dans le cadre de notre problématique.

Dès lors, l'implication de cette nouvelles approches par les aérosols se traduit pour EDF par deux types de stratégies sur site pouvant être préconisés en dehors de la modélisation, à savoir : mesures dans les panaches issus de tours aéroréfrigérantes en fonctionnement (application sur le CNPE de Chinon) et expérimentations sur circuits-pilotes.

2. DÉMARCHE ACTUELLE PAR LA MODELISATION DE LA DISPERSION DU PANACHE DU CNPE DE CHINON

2.1. Présentation

Dans la démarche d'évaluation du risque utilisée actuellement par le SEM, l'évaluation des expositions est fondée sur la modélisation de la dispersion du panache. Ce travail consiste en effet à estimer les concentrations ambiantes en légionelles induites par les tours de refroidissement. Il a été effectué grâce à un modèle de dispersion atmosphérique pour les tours d'une centrale de plus grande hauteur et pour la centrale de Chinon, où une retombée rapide du panache se fait sur le site de la centrale.

Le groupe Météorologie Appliquée et Environnement Atmosphérique (MAEA) d'EDF Recherche et Développement (R&D) a réalisé en 2001 un ensemble de calculs de dispersion atmosphérique donnant les concentrations en légionelles dans l'air autour des tours aéroréfrigérantes de CNPE. Ces résultats permettent de comparer, sous certaines hypothèses, les probabilités d'exposition aux légionelles à des distances plus ou moins éloignées par rapport au point source des tours aéroréfrigérantes de la centrale nucléaire de Chinon, par exemple.

2.2. Méthodologie

Les concentrations en légionelles générées dans l'air ambiant par les rejets atmosphériques d'une source d'émission permanente varient continuellement au gré des conditions météorologiques et, plus particulièrement, des fluctuations du vent et de l'évolution de la structure thermique de la basse atmosphère. Une évaluation convenable de la concentration en légionelles dans l'air implique donc la mise en œuvre de moyens permettant d'appréhender cette variabilité dans l'espace et dans le temps et d'exprimer le résultat en termes statistiques.

Pour cela, la méthodologie requise repose sur un modèle analytique de dispersion atmosphérique, le code MULTIPOL (mis au point par EDF R&D), qui estime les concentrations en légionelles dans l'air ambiant au niveau du sol. Cet outil s'appuie sur les recommandations de l'agence environnementale américaine (USEPA). Il considère les mêmes équations que le code de référence pour les études d'impact aux Etats Unis : ISC3. Il s'agit à la base d'un modèle classique de panache « gaussien rectiligne » basé sur la formulation de Pasquill des écarts-types et des classes de stabilité (terme générique couvrant des programmes de calcul assez divers construits autour d'un concept de base commun et désormais classique dans ce domaine). Il prend en compte les chroniques de données météorologiques horaires du site sur plusieurs années, les caractéristiques spécifiques du site étudié et la hauteur des panaches (données d'émission). Il s'agit d'un programme de calcul conçu pour simuler des processus de dispersion atmosphérique, et ce dans le but d'estimer les concentrations en polluants dans l'air ambiant résultant de rejets de gaz ou de fines particules. Il concerne avant tout des rejets issus de cheminées industrielles, mais peut aussi être appliqué à d'autres types d'émissions permanentes.

Avant toute interprétation de résultats, il faut toutefois tenir compte des hypothèses de travail retenues pour la modélisation à plusieurs niveaux. Il a été considéré que les légionelles émises par les aéroréfrigérants atmosphériques sont contenues dans des gouttelettes d'eau entraînées au sein du panache (phénomène de primage). Les calculs sont effectués avec des concentrations en *Legionella pneumophila* dans l'eau des circuits de refroidissement égales à 10^5 UFC/l, c'est-à-dire la valeur maximale admissible dans le cadre de la réglementation en vigueur pour les ICPE. Le débit de légionelles dans le panache est considéré comme directement proportionnel au débit de primage, la valeur prise pour le taux de primage des grandes tours étant issue des mesures (0,003 %). Toutes les gouttelettes d'eau de primage chargées en légionelles ont un diamètre admis inférieur à 10 μm et sont donc considérées comme potentiellement dangereuses, puisqu'il

est communément admis que seules les gouttelettes de cette taille sont susceptibles de pénétrer profondément dans les poumons et d'être à l'origine de pathologies chez l'homme. On considère que 100 % des légionelles survivent pendant toute la durée de transfert sur le site et sur toute la zone de retombée du panache étudiée.

D'autre part, les données météorologiques considérées sont la vitesse et la direction du vent, la nébulosité totale et la température, ainsi que différentes classes de stabilité de l'atmosphère. Ces données ont été acquises auprès de Météo France sur une période de cinq ans allant du 01/01/1996 au 31/12/2000. Enfin, l'étude considère que la tour en question fonctionne de façon permanente.

2.3. Résultats

Les résultats de cette étude seront utilisés *in fine* pour établir une estimation du risque lié à la présence de légionelles dans l'air pour les populations environnantes.

Ce code permet donc dans notre cas de calculer la concentration en légionelles dans l'air ambiant au niveau du sol (heure par heure et en tout point du maillage de la zone étudiée), de construire des cartes de concentration dans le milieu et d'avoir une approche statistique et spatiale de l'exposition aux légionelles issus des tours aéroréfrigérantes.

Les résultats obtenus de cette manière sont donnés pour un aéroréfrigérant sous forme de cartes décrivant l'impact du réfrigérant sur l'ensemble de la zone, pour chaque site étudié. Un exemple de carte obtenue pour le site de Chinon est fourni en Annexe 3.

Les tours aéroréfrigérantes des CNPE sont implantées en milieu rural. Les populations environnantes susceptibles d'être exposées aux zones de retombée du panache de ces tours sont situées dans un rayon de 5 km pour les aéroréfrigérants de Chinon, mais la localisation de la population la plus fortement exposée varie selon le type de tour.

On peut voir sur ces cartes, dans le cas de Chinon, que les doses d'exposition quotidiennes maximales sont rencontrées à proximité immédiate du site, voire sur le site lui-même du fait de la faible élévation du panache. Le gradient des doses d'exposition décroît ensuite rapidement avec la distance.

A partir d'une concentration de 10^5 UFC/L dans l'eau circulante, la modélisation montre que les concentrations maximales en légionelles en moyenne annuelle en zone habitée sont pour la centrale de Chinon de $3,5 \cdot 10^{-2}$ au niveau de la centrale et de $2,7 \cdot 10^{-3}$ UFC/m³ d'air à 3 km, zone où se situe les premières habitations, sous l'hypothèse de survie de 100 % des légionelles jusqu'à cette zone.

Ensuite, le travail d'évaluation quantitative du risque selon l'approche par modélisation consiste, à partir de ces données de concentrations dans l'air modélisées, à calculer un nombre de malades potentiels dans la population exposée à partir d'hypothèses de calcul concernant la durée d'exposition, le débit respiratoire, la répartition des légionelles dans l'air et la relation dose-réponse, mais aussi en considérant les populations exposées à partir des données de répartition de la population autour de la zone de retombée du panache.

Cette première étape de l'évaluation de l'exposition des populations peut à elle seule fournir des pistes intéressantes pour la gestion des risques en mettant en évidence les niveaux d'exposition aux légionelles des populations environnant les centrales à différentes distances. Mais cette étude n'est qu'une démarche exploratoire d'évaluation du risque légionelles lié aux tours aéroréfrigérantes des CNPE. Les résultats de cette étude sont à manipuler avec précaution du fait des nombreuses incertitudes demeurant à toutes les étapes de calcul et des inévitables simplifications accompagnant la modélisation.

A notre connaissance, cette démarche d'évaluation quantitative des risques autour des tours de CNPE est la première effectuée à ce jour. Mais, il s'agit de « l'avant Noroxo ». Compte-tenu des incertitudes pesant sur cette démarche, il est justifié de se tourner vers l'autre approche par la métrologie des aérosols, d'autant qu'on dispose d'un exemple concret de faisabilité, qui va être présenté maintenant.

3. MESURE DES LÉGIONELLES DANS LES REJETS ATMOSPHÉRIQUES D'INSTALLATIONS INDUSTRIELLES LORS DE L'ÉPIDÉMIE DU PAS-DE-CALAIS

3.1. Avant-propos

L'épidémie causée par l'usine Noroxo a été d'une rare ampleur sanitaire et s'est caractérisée par une longue durée et une dispersion importante des cas de légionellose déclarés. Cette épisode a été suivi de près par le Service des Etudes Médicales, le Docteur Pierre-André Cabanes (Directeur-Adjoint du SEM) étant l'un des experts nationaux du dossier. Nous disposons d'un certain nombre d'éléments en termes de métrologie, dont nous pouvons prendre connaissance comme retour d'expérience pour établir une stratégie de mesure de la contamination en légionelles au niveau des grandes tours aéroréfrigérantes des centrales nucléaires. Lors de cette campagne de mesures d'aérosols sur site, les sources de légionelles étudiées dans cette application du CSTB sont la lagune de l'usine Noroxo, ainsi que des tours sur d'autres sites industriels, mais on peut très bien imaginer d'appliquer cette approche sur une grande tour de CNPE.

3.2. Objet

A la demande du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, le CSTB a apporté son concours aux investigations relatives à l'épidémie de légionellose dans la région de Lens (Pas-de-Calais). Des prélèvements de légionelles dans l'air ont été réalisés par le CSTB entre le 12 et le 23 janvier 2004 au moyen d'un équipement expérimental sur des sites sélectionnés par les autorités locales (Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement). Ces échantillonnages viennent compléter les détections réalisées dans l'eau des installations par des techniques conventionnelles prévues par la réglementation.

Le développement de la métrologie employée durant cette campagne est le fruit d'une recherche engagée depuis plusieurs années par l'équipe du Dr Enric Robine, dans le cadre d'un programme du CSTB sur la pollution de l'air intérieur. Cette action fait l'objet depuis 2002 d'un partenariat avec une équipe INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) de Nancy (Dr Laurence Mathieu) dans le cadre d'un financement de l'AFSSE (Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale). L'objectif de cette étude est d'évaluer la concentration aérienne de légionelles potentiellement produites par des installations industrielles à risque, en particulier la société Noroxo, mise en cause lors de cette épidémie.

Au préalable ont été examinés, en concertation avec la DRIRE de Béthune, sept sites industriels de la région de Lens présentant des tours aéroréfrigérantes. Cette première inspection a permis d'orienter le choix des moyens de mesure (proximité de sources potentielles de biocontamination, accessibilité et facilité de l'instrumentation ...) et des sites à investiguer. En raison de son accessibilité, l'entreprise Noroxo située à Harnes (62) a été l'une des deux premières enquêtées (campagne de mesures du 12-15 janvier 2004), on y trouve un lagunage aéré et des tours aéroréfrigérantes à l'arrêt. Des développements complémentaires, dans les laboratoires du CSTB, ont été nécessaires pour évaluer les rejets des tours des autres entreprises (campagne du 22-23 janvier 2004). Après cette investigation préliminaire des sites industriels permettant la définition de la stratégie d'échantillonnage, la démarche adoptée se décline en deux étapes : le prélèvement d'aérosols autour de la lagune du site, puis la mesure de la flore bactérienne totale, ainsi que l'analyse spécifique des légionelles dans les rejets atmosphériques de la société Noroxo. Les tours aéroréfrigérantes de Noroxo étant à l'arrêt lors de ces investigations, les rejets de légionelles mesurables sont ceux émis par les aérateurs de la lagune.

3.3. Méthodologie de prélèvement d'air et d'analyse des bactéries

3.3.1. Collecte des biocontaminants

D'après ce qui a été vu précédemment, le CSTB utilise une technique parmi les techniques de choix pour la métrologie des bioaérosols de légionelles, à savoir un préleveur de type cyclone, dont le principe est celui de l'impingement. Pour ces essais, un volume de 150 mL d'eau déionisée filtrée (0,2 µm) est utilisé. L'eau de collecte circule en circuit fermé, ce qui permet de concentrer les particules aspirées. L'ensemble est démontable afin de permettre un nettoyage et une décontamination complète entre chaque échantillonnage. Le prélèvement est effectué à un débit contrôlable de l'ordre du m³.min⁻¹. Une photo de ce biocollecteur est disponible en Annexe 4.

3.3.2. Localisation de l'échantillonnage pour les lagunes de l'entreprise Noroxo

Sur le terrain, il faut placer le dispositif autour de la source selon un plan d'échantillonnage. Dans ce cas, il s'agissait de lagunes aérées, utilisant des dispositifs d'aération semblables (pompe avec refoulement en surface). Les prélèvements ont été réalisés avec les aérateurs en fonctionnement, en positionnant la sonde de prélèvement sur le bord de la lagune au plus près de l'aérateur et sous le vent.

Sur le site de Noroxo, trois prélèvements ont été réalisés de manière suivante :

- A environ 60 m de la lagune en amont par rapport au vent
- Au plus proche de l'aérateur
- A 270 m de l'aérateur sous le vent.

3.3.3. Analyse des prélèvements

3.3.3.1. Mesure de la flore bactérienne générale

Les prélèvements aériens font l'objet de dénombrements de la flore bactérienne cultivable. Le comptage des colonies se fait à l'oeil nu et sous loupe binoculaire après 3 et 5 jours d'incubation à 25 °C sur gélose TCS (Trypto Caséine Soja). Les résultats sont exprimés en Unité Formant Colonie par mètre cube d'air.

La flore bactérienne totale prélevée est estimée grâce au dénombrement direct par épifluorescence (DAPI). Sachant que la majorité des bactéries viables de l'environnement rencontrent des difficultés à se multiplier sur des milieux de culture usuels (microorganismes « stressés », BVNC), nous utilisons une méthode qui permet d'estimer la concentration bactérienne totale aéroportée, c'est-à-dire, les fractions cultivable et non cultivable.

3.3.3.2. Mesure spécifique des légionelles

La fraction cultivable de légionelles est estimée et le comptage des colonies se fait après 7 et 10 jours à 37 °C sur géloses GVPC et BCYE. Les résultats sont en UFC de *Legionella sp*/m³.

La détection des légionelles est également réalisée grâce à la méthode de l'hybridation in situ. Cette technique FISH appliquée aux aérosols de légionelles reste pour l'heure un dosage expérimental. Un travail de recherche portant sur la pertinence métrologique et épidémiologique de cette méthodologie sur des aérosols bactériens est en cours de réalisation. En partie financé par l'AFSSE et la DGS, ce travail est conduit par l'équipe INSERM [EP] 2R (Dr Laurence Mathieu) en collaboration avec le CSTB (Dr Enric Robine).

3.4. Résultats

Le tableau présenté en Annexe 5 donne un récapitulatif des résultats d'analyse pour les prélèvements de particules en suspension dans l'air autour de la lagune de Noroxo.

Tout d'abord, on peut remarquer que tous les points investigués pour la lagune produisent des aérosols bactériens à des concentrations de l'ordre de 10^5 à 10^6 bactéries par m^3 , dont une fraction cultivable de 10 à 10^3 UFC / m^3 . L'écart observé entre les fractions totale et cultivable est imputable aux techniques employées. La première, qui utilise le marquage spécifique des cellules bactériennes, permet de détecter la flore bactérienne totale. La seconde, basée sur la capacité des microorganismes à se développer sur milieu de culture, permet difficilement d'accéder aux bactéries de l'environnement, qui, bien que viables, sont pour la plupart incapables de se multiplier sur de tels substrats. Ces bactéries viables mais non cultivables constituent la majorité de la flore bactérienne aéroportée au vu de ces résultats.

Concernant les légionelles, le CSTB en a détectées dans tous les aérosols prélevés issus des lagunes de Noroxo ou des autres sites industriels investigués. Ce résultat montre très certainement l'ubiquité de ce germe hydrotellurique naturellement rencontré dans l'environnement. Néanmoins, rapporté aux émissions des tours et lagunes aérées, ce microorganisme représente, avec des pourcentages compris entre 0,05 et 0,09 %, une fraction faible de la flore bactérienne totale mesurée.

En outre, la majorité des prélèvements autour des tours ou lagunes des autres industries a montré une absence de culture de légionelles, même si elles avaient été détectées par la méthode FISH à des niveaux de concentration de l'ordre de 10^3 légionelles / m^3 . Seule la lagune aérée de Noroxo a présenté un résultat notable avec des niveaux de légionelles cultivables (UFC / m^3) semblables à ceux évalués par FISH (légionelles / m^3).

Comparé à la mesure réalisée au niveau de la lagune Noroxo (10^3 UFC / m^3), le prélèvement placé à 270 m de la source potentielle (sous le vent) présente encore près de 10^2 UFC / m^3 de *Legionella pneumophila* majoritairement de séro groupe 1. On observe ainsi un phénomène de dilution d'un facteur 10. Le témoin placé à 60 m en amont de la lagune montre également un résultat positif par culture mais inférieur à la limite de quantification.

3.5. Bilan : implications pour notre problématique

Cette étude montre qu'il est techniquement possible de mettre en évidence la présence de légionelles dans l'air par la méthode de culture et la méthode FISH, et ce même à 270 m de distance de la source émettrice. Les résultats sont parfois non quantifiables par la FISH. L'absence de résultats par cette dernière méthode peut-être s'expliquer par un état de dormance des bactéries présentes dans l'air et confirme l'intérêt d'avoir recours à plusieurs méthodes d'analyse en parallèle. Il serait intéressant d'ajouter une analyse par PCR plus sensible afin de voir si on observerait un résultat positif dans ces circonstances. Par ailleurs, la comparaison des résultats avant et après la lagune par apport au vent montre bien l'influence de la présence de la source sur les concentrations en bactéries.

Pour la première fois appliqué en atmosphère extérieure, ce protocole de prélèvement du CSTB semble donc faisable en pratique et donne des résultats cohérents et pertinents. Ils apportent des informations au niveau de la contamination de l'air tout à fait utilisables dans le cadre d'une réflexion sur l'exposition pour les populations. En ce qui nous concerne, cette démarche concluante concerne un aspect particulièrement incertain encore dans la caractérisation de l'exposition des populations aux légionelles, c'est-à-dire l'estimation de la contamination de l'air. C'est pourquoi cela implique pour notre problématique d'envisager de se tourner vers la métrologie des aérosols pour remettre en question la méthodologie de l'évaluation de risque actuelle. Cette campagne permet en effet de prospecter la mise en place de deux stratégies d'étude en dehors de la modélisation, dans le but de répondre à la problématique légionelles chez EDF, qui utiliseraient ce type de mesures des aérosols directement sur le site étudié. La première, qui va être présentée ci-après, consiste à effectuer des mesures dans des conditions réelles directement dans le panache s'échappant des tours aérorefrigérantes en fonctionnement. La seconde met en œuvre un circuit-pilote sur le site à échelle réduite.

4. PRÉSENTATION DE LA CAMPAGNE DE MESURES DES AÉROSOLS DE LÉGIONELLES EN COURS SUR LE CENTRE NUCLÉAIRE DE CHINON

4.1. Cadre de l'étude

Le premier type d'étude possible lancée par EDF suite aux investigations du CSTB dans le Pas-de-Calais est une campagne de mesures des légionelles dans les panaches sur site. Elle a débuté avec le CNPE de Chinon, puisque le CNPE est supposé induire la plus forte exposition des populations du fait de la faible hauteur de ses tours aéroréfrigérantes. Cette étude s'inscrit dans le cadre de la démarche engagée par EDF pour l'évaluation du risque sanitaire lié à la présence de légionelles au niveau de ses installations de production d'électricité. Elle vise à renseigner sur la potentialité des réfrigérants utilisés sur les centres nucléaires à disperser des aérosols de légionelles.

Nous avons pu avoir accès au cahier des charges décrivant la campagne de mesures initiée durant cet été par le CSTB. Au moment où ce mémoire est rédigé, le CSTB commence la réalisation de la campagne de mesures sur le site de Chinon. Pour cela, cette approche reprend la même méthodologie utilisée pour l'épidémie de légionellose dans le Pas-de-Calais.

L'étude vise la caractérisation des aérosols de légionelles au niveau et à la périphérie des quatre réfrigérants du centre nucléaire de Chinon.

La démarche repose sur l'évaluation du terme source avec l'estimation :

- d'un réfrigérant (variabilité intra)
- de la variabilité au sein des différentes tranches (variabilité inter).

4.2. Matériel et méthodes utilisés

4.2.1. Collecte des aérosols biologiques

Deux types de prélèvement de l'air ont été sélectionnés : une technique en mode statique et une en mode dynamique.

Tout d'abord, la démarche adoptée consiste à évaluer spécifiquement les aérosols microbiologiques (flore bactérienne générale et légionelles). A cet effet, le même préleveur statique de type cyclone que pour Noroxo est utilisé pour collecter les bactéries aéropartées. Les prélèvements sont tous effectués dans le panache. Lorsque la tour est accessible, le biocollecteur est situé directement dans le panache, sinon, la collecte est réalisée à distance en acheminant les rejets du panache jusqu'au biocollecteur par un système de tubes. Les différentes tubulures sont remplacées entre chaque zone de prélèvement.

Concernant les aérosols microbiologiques, la première approche consiste à apporter la preuve de la présence d'aérosols de légionelles. Les premières collectes sont réalisées sous les moto-ventilateurs en triplicata à 2 et 4 m de la paroi de l'îlot central. Si les résultats sont positifs (présence d'aérosols de légionelles), il est proposé d'estimer la concentration de ces microorganismes par le biais de quinze prélèvements consécutifs sur deux jours.

La localisation de l'échantillonnage est définie selon les concentrations et la dispersion des mesures physiques observées à un Compteur Optique à Particules (COP). En parallèle, la collecte des aérosols microbiologiques est en effet effectuée également en dynamique grâce à un COP à un débit contrôlable de 65 m³/h. Le principe du compteur optique consiste à envoyer un rayon lumineux (laser) sur un petit volume de mesure à travers lequel sont aspirées les particules à un débit donné. La quantité de lumière diffusée par chaque particule en fonction de sa dimension est mesurée par un photodétecteur. L'amplitude du signal est ensuite enregistrée par un analyseur multicanaux qui l'affecte au canal approprié. La fréquence des impulsions reçues dans chacun des canaux permet d'obtenir la concentration pour chaque classe de particules. Il permet d'évaluer la granulométrie (de 0,3 à 20 µm) et la concentration des aérosols à

proximité du biocollecteur (hauteur du prélèvement à 1,20 m). Cet appareil échantillonne l'air à un débit de 1,2 L / min et a une sensibilité d'une particule par litre.

Le COP, permettant de statuer sur la stabilité des aérosols produits en termes de concentration et granulométrie, est employé pour évaluer la variabilité intra-réfrigérant avec des mesures :

- En dessous des moto-ventilateurs à 2 et 4 m de la paroi de l'îlot central
- Au-dessus des moto-ventilateurs à trois niveaux de deux diffuseurs.

La détermination de la variabilité inter-réfrigérant sera réalisée par la mesure en dessous des moto-ventilateurs sur les trois autres réfrigérants.

4.2.2. Plan d'échantillonnage

Sur place, une fois la technique de prélèvement choisie, il faut placer l'appareil sur le site en fonction du plan d'échantillonnage prévu, à savoir à la fois à la source au niveau des aéroréfrigérants et dans l'environnement autour des aéroréfrigérants.

Dans un premier temps, au niveau des réfrigérants, il s'agirait de caractériser un réfrigérant en fonctionnement. La mesure des aérosols sur 2 tours de ce réfrigérant est proposée (Annexe 6). Cette caractérisation devrait permettre de déterminer le ou les points d'échantillonnage d'intérêt qui seront utilisés sur les trois autres réfrigérants par la suite. Au niveau des tours, le CSTB propose de mesurer les aérosols au-dessus des moto-ventilateurs en utilisant les orifices préexistants répartis sur l'ensemble de l'ouvrage. Il est proposé également d'évaluer les aérosols de légionelles sous les tours, en dessous de l'ensemble des moto-ventilateurs de manière à obtenir une valeur globale avant l'émission (Annexe 7).

Par ailleurs, en raison des aérosols potentiellement produits au pied du réfrigérant, le CSTB envisage de réaliser une mesure sous le vent au bas de la tour.

De plus, il est prévu de mesurer la concentration de légionelles dans l'eau du bassin chaud. Pour disposer d'éléments de comparaison permettant la formulation de la fonction de transfert eau/air du réfrigérant, il paraît indispensable d'appliquer aux prélèvements d'eau la même méthode d'analyse spécifique développée pour évaluer les légionelles aéroportées.

Dans un deuxième temps, dans l'environnement des aéroréfrigérants, l'étude portera sur la dispersion potentielle des aérosols de légionelles à la périphérie des installations. La caractérisation de la dispersion sera évaluée sur le site au niveau du sol selon les conditions climatiques locales (vent, température/humidité, ensoleillement).

Les mesures réalisées sous le vent du panache seront complétées par celle du « bruit de fond » environnemental qui sera, de préférence, effectuée aux « points de surveillance de l'environnement » (station de contrôle atmosphérique) appartenant à EDF situés à proximité du site mais en dehors de la centrale.

Le CSTB propose de conserver le protocole d'échantillonnage qui avait été employé lors de nos investigations en région Nord. L'air est échantillonné à 2 km en amont des sources potentielles (bruit de fond), puis selon les conditions climatiques locales, des mesures sont réalisées sous le vent du plus loin au plus proche de la « source ». Une unité mobile de collecte des aérosols est employée au sol et se positionne en fonction des conditions climatiques locales (direction et vitesse du vent, humidité et température) ; ces indications sont fournies par une station météorologique locale et par une station mobile embarquée. Connaissant l'impact potentiel des rayonnements sur la survie de l'aérosol de légionelles, des mesures de jour et de nuit sont envisagées. L'intensité des rayonnements sera estimée à l'aide d'un solarimètre.

Par ailleurs, la campagne d'arrêts, débutée en 2004 sur le site de Chinon, pourra être exploitée pour juger de l'impact du nettoyage des réfrigérants (mesurages avant et après l'arrêt des différentes tranches). En outre, la mesure des légionelles dans l'eau des circuits de refroidissement devrait fournir des éléments pour établir la fonction de transfert eau/air des différentes tours aéroréfrigérantes.

4.2.3. Types d'analyse des échantillons utilisées

Une fois les prélèvements effectués, les échantillons obtenus sont analysés de plusieurs manières, comme dans le cas des investigations lors de l'épidémie du Pas-de-Calais, à savoir une mesure des bactéries totales (épifluorescence au DAPI), de bactéries totales cultivables uniquement (culture), ainsi que trois mesures spécifiques des légionelles (FISH, PCR) et la fraction cultivable des légionelles en plus.

La recherche et la quantification des *Legionella* s'effectuent également par la méthode PCR quantitative. Une ou plusieurs séquences-cibles sont amplifiées, afin de détecter et différencier les acides nucléiques provenant de bactéries appartenant au genre *Legionella* et à l'espèce *pneumophila*.

Différentes approches méthodologiques sont donc mises à profit : culture, techniques cellulaires (DAPI, FISH) et techniques destructives (PCR effectuée par un sous-traitant). Le but est ainsi d'avoir plusieurs points de vue sur la composition de l'aérosol issu de la centrale en terme de microorganismes présents. Ces résultats seront par la suite mis en parallèle, afin d'essayer d'établir des interprétations au niveau sanitaire pour évaluer l'exposition des populations.

4.3. Planning prévisionnel de la campagne de mesures

La durée prévue de l'étude est de 4 mois, avec remise du rapport d'étude pour la fin 2004, et sa planification comprend les phases d'investigations suivantes :

- la caractérisation d'un réfrigérant en fonctionnement avec la détermination du ou des points de contrôle pertinents de l'aérosol de légionelles (juillet-août)
- l'instrumentation des réfrigérants 1,2,3 et 4 en fonctionnement (septembre-octobre)
- la mesure quasi simultanée au niveau des réfrigérants et sur le site (octobre-novembre)
- l'exploitation des résultats et la rédaction du rapport d'étude (fin novembre).

Pour l'ensemble de cette campagne du CSTB, les moyens humains mis en jeu par le Dr. Robine sont un ingénieur chargé du pilotage (terrain / laboratoire), un ingénieur d'application et deux techniciens (terrain), ainsi que deux autres techniciens de laboratoire.

Les équipements de laboratoire et de terrain mobilisés sont les suivants :

- Au laboratoire de microbiologie P2/P3 du CSTB : étuves, autoclaves, 2 postes de sécurité microbiologique, 2 microscopes à épifluorescence avec dispositifs d'analyse d'images, rampe de filtration (6 postes + pompes à vide), centrifugeuse, sondes moléculaires, poste de préparation des milieux, poste de filtration.
- Sur le terrain : 5 dispositifs de prélèvement des aérosols de légionelles, 2 compteurs de particules et informatique associé, station météo (solarimètre thermohygromètre, anémomètre, girouette, acquisition des données), camion-laboratoire (collecte des aérosols, mise en culture et pré-incubation sur site, conservation des échantillons), matériel de protection individuelle fourni par EDF dans la première phase de l'étude (caractérisation d'un réfrigérant).

5. PROPOSITION D'ÉTUDE SUR CIRCUIT-PILOTE

5.1. Introduction

Le deuxième type d'étude que l'on peut proposer est une expérimentation sur pilote placé sur le site et qui requiert des mesures de légionelles dans les aérosols directement sur le site mais dans des conditions différentes de la réalité.

Un manque de données sur la fonction de transfert des légionelles de l'eau vers l'air empêche de pouvoir avoir des résultats précis de modélisation de la dispersion du panache et entraîne donc des incertitudes sur les résultats de l'évaluation du risque sanitaire. De plus, un problème de métrologie des aérosols n'a pas permis jusqu'à présent de réaliser des mesures suffisamment fiables dans le panache pour évaluer ce

taux de transfert. Par conséquent, l'idée d'utiliser un pilote d'aéroréfrigérant a semblé intéressante dans le but d'essayer de répondre à notre problématique. Il s'agirait ainsi de pouvoir récupérer l'intégralité du panache s'échappant d'un aéroréfrigérant à échelle réduite et de comparer, grâce à des analyses de légionelles dans le panache prélevé, les concentrations retrouvées dans l'eau du circuit-pilote avec celles mesurées dans le panache, afin d'en déduire la fonction de transfert des légionelles de l'eau vers l'air. Pour ce type d'étude sur pilote, deux moyens d'essais de la R&D d'EDF sont utilisables, c'est-à-dire la plate-forme SPECTRE (Système Pilote d'Étude des Circuits Tertiaires de Refroidissement des Eaux) et la plate-forme PEEP (Pilote d'Essai d'Entartrage de Packings).

5.2. Présentation sommaire du moyen d'essai SPECTRE

Le moyen d'essai SPECTRE a été créé en 2001, à l'origine principalement pour l'évaluation et le dimensionnement des traitements anti-amibiens et anti-légionelles alternatifs à ceux existants. Ce moyen d'essai a été mis en œuvre pendant 3 ans sur le site de Civaux dans ce cadre. Une nouvelle étude de traitement anti-amibien a été programmée sur ce site jusqu'à mi 2004 avec ce moyen d'essai.

Il est constitué de 3 pilotes identiques. Ce sont des reproductions à l'échelle d'environ 1/100 000^{ème} des circuits de refroidissements tertiaires semi-fermés des CNPE (variable selon les circuits simulés : 1/128 000^{ème} dans le cas de Civaux). Cet équipement est représenté sur les photos en Annexe 8.

5.2.1. Présentation des boucles

Chaque boucle est constituée de 3 éléments modulaires représentant les principaux éléments d'un circuit de refroidissement (tertiaire) à savoir : un module simulant le bassin froid avec conduite d'alimentation en eau d'appoint du CNPE et conduite d'évacuation des eaux de rejets, un module simulant le condenseur avec circulation de vapeur à l'extérieur et d'eau à l'intérieur (l'eau dans chaque tronçon de 2 m du tube de 14 m au total est donc réchauffée par la vapeur de la même manière que dans les aéroréfrigérants réels et arrive ensuite dans le bassin chaud) et un module simulant l'aéroréfrigérant par un assemblage de garnissage identique à la réalité (1,5 m). Un ventilateur permet l'évacuation du panache, puisqu'il n'y a pas ici d'évacuation naturelle, de la même manière que pour le CNPE de Chinon.

Par ailleurs, actuellement, l'ensemble des rejets d'air (panache de l'aéroréfrigérant) et d'eau (eau de purge) de chaque boucle est collecté quasiment intégralement pour ensuite être canalisé dans un système de tuyauterie où il se condense. Pour des raisons de sécurité liées à la présence potentielle de germes pathogènes, il est acheminé enfin vers une unité de traitement des effluents par chloration commune aux 3 boucles. On peut toutefois envisager d'adapter un système au niveau de la sortie du panache qui assurerait la récupération totale du panache et son prélèvement pour analyse à la place des traitements de désinfection utilisés à l'heure actuelle.

5.2.2. Fonctionnement global du circuit

L'eau froide pompée dans le circuit d'eau d'appoint est acheminée dans le bassin froid. Elle est ensuite dirigée vers le condenseur par une pompe de circulation. Le condenseur est constitué, en partie basse d'un bouilleur (générateur de vapeur sous vide) et en partie haute d'un tube en inox de longueur et de diamètre équivalent à ceux des condenseurs de CNPE. La vapeur au contact de ce tube provoque le réchauffement de l'eau. L'eau réchauffée dans le tube transite dans une cuve simulant le séjour chaud puis est refroidie au niveau du packing de l'aéroréfrigérant par contact avec l'air circulant à contre-courant à l'aide d'un ventilateur. Le packing mis en place sur les boucles est équivalent à celui mis en place sur le circuit de Civaux à l'échelle 1 sur une section verticale identique (1,5 m). Il peut être modifié selon l'essai afin de se caler sur celui de Chinon dans un premier temps par exemple.

Les trois pilotes sont équipés d'un système de tiroirs pour avoir accès au garnissage de l'aéroréfrigérant pour contrôler le développement des microorganismes et observer ainsi, par exemple, les effets éventuels du biofilm sur la prolifération des légionelles.

Par ailleurs, l'air de refroidissement peut être conditionné par chauffage et humidification. Pour se placer dans des conditions similaires à celles des circuits et observer l'influence de différents paramètres, il est possible de régler plusieurs paramètres de fonctionnement du circuit sur les boucles expérimentales comme :

- Le débit de circulation de l'eau dans les tubes du pilote
- Le volume d'eau permettant de fixer le temps de rotation
- Le débit d'appoint permettant de fixer le temps de renouvellement
- La température de l'eau en sortie de condenseur
- La température de l'eau sortie aéroréfrigérant
- La différence de température de l'eau entre l'entrée et la sortie du condenseur
- Le débit d'air de refroidissement
- La température et l'hygrométrie de l'air de refroidissement...

L'ensemble des paramètres est enregistré en continu par informatique et peut être suivi et modifié à distance. L'intérêt de disposer de trois pilotes identiques est de pouvoir réaliser des comparaisons entre plusieurs situations avec des paramètres réglés différemment et de bénéficier d'un circuit témoin, par exemple.

5.3. Présentation sommaire du moyen d'essai PEEP

Dans l'optique de la compréhension des phénomènes qui concourent à l'entartrage des packings, le Département LNHE de la R&D d'EDF a été sollicité pour évaluer le comportement et l'efficacité anti-tartre du cuivre et du zinc circulant dans le corps d'échange. La mise en œuvre de cette étude a conduit à l'époque à la réalisation de 2 modules identiques simulant, à petite échelle mais en proportion réelle, les échanges thermiques (eau/air) se produisant sur les packings des tours de réfrigération du circuit de refroidissement des CNPE. Ce moyen d'essai PEEP ne simule que la partie aéroréfrigérant (corps d'échange) du circuit de refroidissement dans chacun des deux modules. L'échange thermique est reproduit avec arrivée d'eau chaude, refroidie au contact de l'air, puis une boucle récupère l'eau qui retourne vers le condenseur. Il a eu pour objectif jusque-là d'évaluer l'impact du cuivre et du zinc circulants sur l'entartrage des packings par un suivi régulier de la prise en masse des corps d'échange. Une photo de PEEP est présentée en Annexe 9.

Chaque module est alimenté par un piquage installé en sortie de condenseur tranche 1. Le module 2 comprend, de surcroît, une injection de cuivre et de zinc en amont de l'aspersion, qu'il est envisageable d'éliminer dans notre cas. Le rejet est quant à lui réinjecté par un second piquage en sortie condenseur. Un système d'aspiration est placé sous le corps pour simuler l'aspiration dans l'aéroréfrigérant.

Dans le cadre de notre problématique, il est possible d'envisager aussi le retrait du système de traitement par rayons ultraviolets, ainsi que le pare-gouttes, afin de le remplacer par un système de récupération du panache, de la même manière que pour SPECTRE. On peut imaginer une sorte de capot, muni de deux branches descendantes qui renverraient l'eau dans un récipient pour l'échantillonnage. Il faut, de même que pour SPECTRE, que le panache puisse être récupéré en intégralité pour pouvoir obtenir des résultats fiables sur le coefficient de transfert et pour éviter tout risque de contamination. L'existence des deux colonnes en parallèle permet la comparaison de plusieurs situations ou d'un témoin avec un cas étudié.

Cette plate-forme n'est pas pilotée par informatique contrairement à la première.

5.4. Analyse du besoin vis-à-vis de la problématique légionelles

Pour aider à estimer l'exposition aux légionelles, cette action doit être menée dans l'objectif d'une approche globale du fonctionnement du circuit en intégrant les autres problématiques associées à ce fonctionnement (développement de germes pathogènes et passage dans le panache). Ainsi, il est envisageable de lancer un programme d'étude dont l'objectif serait avant tout de déterminer le coefficient de transfert atmosphérique des légionelles. En raison des fortes lacunes persistantes, il s'avère que le passage des légionelles de l'eau vers l'air reste un phénomène complexe qui peut nécessiter, pour l'étudier, en plus des mesures dans les tours proposées précédemment, la mise en œuvre de moyens d'essais de ce type permettant de reproduire fidèlement les conditions de fonctionnement des circuits de refroidissement.

L'utilité d'une telle expérimentation sur pilote serait ainsi d'effectuer des mesures dans les aérosols pour définir le transfert eau vers air et d'observer les effets de certains paramètres sur les concentrations en légionelles, en particulier présence de biofilm. En effet, ils pourraient notamment être mis à profit pour :

- Calculer le coefficient de transfert atmosphérique des légionelles
- Améliorer la compréhension des phénomènes d'aérosolisation
- Caler les modèles de dispersion du panache avec le taux de transfert ainsi observé
- Evaluer l'influence des traitements de désinfection
- Rechercher les facteurs d'influence sur la concentration en légionelles.

Ainsi, pour pouvoir mener à bien les études proposées, il semble absolument nécessaire de déménager le moyen d'essais vers le site pour lequel est mené l'évaluation du risque. Par ailleurs, les installations sont autonomes en termes de moyens, hormis les besoins en logistique et en fluides.

Ces moyens d'essais peuvent être indistinctement utilisés pour le type d'étude envisagé, puisqu'ils simulent tous les deux les conditions de fonctionnement de l'aéroréfrigérant dans la centrale en utilisant la même eau que la centrale. Mais dans le cas de SPECTRE, on peut jouer sur plusieurs paramètres à l'intérieur du réfrigérant, notamment sur l'humidité de l'air, paramètre influant sur l'écologie des légionelles.

Le choix entre les deux plates-formes d'essais pour ce type d'étude dépend des moyens humains et financiers mis en jeu et de la disponibilité des deux pilotes puisque ceux-ci peuvent déjà être temporairement utilisés pour d'autres études. Mais il dépend également des objectifs fixés lors de la mise en place effective d'une telle étude, qui doivent déterminer si les options supplémentaires de SPECTRE seraient véritablement mises à profit. Dans les deux cas, il est nécessaire d'effectuer, au préalable, une adaptation du système pour l'étude, en particulier au niveau de la récupération du panache. De même, les deux moyens d'essais nécessitent un déménagement préalable sur le site concerné, à condition qu'il y ait présence non sporadiquement de légionelles dans l'eau, ce qui ne pose pas de problème pour le site de Chinon par exemple. Ce déplacement est assez conséquent puisque l'ensemble du dispositif représente une surface d'occupation au sol de 250 m² (70 m² pour le pilote), avec le laboratoire et les zones de stockage du matériel. PEEP est toutefois plus facilement manipulable car il est moins haut que SPECTRE et plus simple d'utilisation ; il devrait donc s'adapter plus facilement à un nouvel emplacement.

PEEP équivaut à une sorte de petit aéroréfrigérant alimenté avec la même qualité d'eau que l'aéroréfrigérant réel de la centrale, puisque l'alimentation se fait au même endroit pour les deux dans la centrale. Ces conditions de fonctionnement sont même probablement plus proches des conditions réelles au niveau de l'aéroréfrigérant. Or, c'est ce qui nous intéresse ici.

On a donc deux systèmes de ventilation forcée disponibles, dont on peut faire varier la puissance des ventilateurs dans les deux cas. Il pourrait donc être intéressant de comparer les deux systèmes, mais il est en pratique plutôt envisageable de faire une étude sur un seul des deux moyens d'essais.

PARTIE 4

Analyse et discussion sur l'estimation de l'exposition des populations aux légionelles contenues dans les panaches des centrales : *Argumentaire sur l'intérêt et le sens du mesurage dans l'air*

1. AVANT-PROPOS

Afin de caractériser l'exposition aux légionelles contenues dans les panaches, il faut disposer de la concentration en agents dans l'air sur le lieu d'exposition. Il a été montré que nous avons pour cela deux options actuellement, à savoir continuer la démarche de modélisation de la dispersion du panache autour des centrales à partir de concentrations en légionelles dans l'eau, ou bien opter pour des mesures de la concentration en agents dans les aérosols en plusieurs points de prélèvement. Dans ce dernier cas, qui n'est encore qu'une démarche exploratoire, les résultats restent incertains. Par conséquent, on peut se demander si, en l'état actuel des choses, la réalisation de mesures dans l'air constituerait véritablement un progrès et apporterait un plus par rapport aux mesures pratiquées dans l'eau dans le cadre de l'estimation des expositions nécessaire à l'évaluation du risque de légionellose.

Cette ultime partie sur l'intérêt et la signification au niveau sanitaire de la métrologie des aérosols de légionelles est basée sur les éléments issus des deux parties précédentes de ce mémoire. Elles ont combiné une étude bibliographique sur les aspects théoriques du problème, le retour d'expérience de l'épidémie de Noroxo au niveau pratique, une visite de terrain sur le site de Chinon concerné par la problématique et la planification d'un projet d'étude sur circuit-pilote. Les apports de ces différentes études théoriques ou pratiques ont été mis en parallèle avec les moyens utilisés actuellement au SEM pour répondre aux besoins de l'estimation des expositions des populations. Des connaissances sur la survie des légionelles dans les aérosols ont également été prises en compte pour parvenir à apporter des éléments de réponse et émettre des propositions et recommandations sur les questions posées.

2. RÉSULTATS DE L'ÉTUDE DES ASPECTS THÉORIQUES ET PRATIQUES DE LA MÉTROLOGIE DES AÉROSOLS

2.1. Aboutissement de l'étude bibliographique sur les incertitudes de la métrologie des aérosols

2.1.1. Introduction

Le bilan des travaux sur les légionelles de l'air laisse présager une variabilité importante de la métrologie des légionelles dans les aérosols.

L'évaluation de la contamination du média d'exposition constitue un aspect particulièrement important de l'estimation de l'exposition. Dans le cas des aérosols biologiques, il a été montré que cette évaluation peut faire appel à diverses techniques de mesure qui produisent des résultats différents en raison, d'une part, de la forte variabilité des concentrations en bactéries de l'air, d'autre part, de l'efficacité des méthodes employées. Très peu de travaux font état de mesures de légionelles dans l'air ; les informations relatives à la variabilité de ces mesures sont donc très limitées. Il est pourtant important de s'efforcer de prendre en compte l'influence de ce paramètre inhérent à toutes les techniques disponibles sur l'estimation de l'aérobiocontamination et donc à fortiori sur l'évaluation du risque de légionellose lié aux centrales.

2.1.2. Principales incertitudes liées à l'échantillonnage de l'air

Les facteurs de variabilité liés au mode de prélèvement sont nombreux. Ils peuvent être reliés directement aux performances du type de biocollecteur retenu. D'une part,

l'efficacité de collecte des appareils dépend de paramètres physiques tels que l'efficacité d'aspiration, l'efficacité de dépôt et les pertes liées aux parois, ce dernier paramètre étant souvent considéré comme négligeable [19]. La capacité de l'appareil à aspirer les particules de l'air dépend elle-même du débit d'aspiration, de la conformation et de la position de la tête de prélèvement [24]. La vitesse de l'air et la nature du support peuvent aussi modifier l'efficacité de dépôt.

D'autre part, l'efficacité de préservation d'un appareil dépend de ses propriétés intrinsèques mais aussi de l'état initial des bactéries dans l'air. L'air ne constitue pas un bon milieu pour le développement des légionelles, puisqu'elles y seraient soumises à des phénomènes de dessiccation qui compromettraient leur survie. Les légionelles de l'air se trouveraient donc le plus souvent à l'état végétatif ou dans un état physiologique altéré et ceci serait d'autant plus exact que leur mise en suspension serait ancienne [19].

Ainsi, les bactéries de l'air, qui sont donc fragilisées, pourraient voir leur viabilité et leur cultivabilité encore altérées par les techniques de prélèvement. Un appareil peut donc avoir une efficacité différente selon les bactéries rencontrées et procéder ainsi à une sorte de sélection de celles qui supportent le mieux les conditions d'échantillonnage. Il y a donc surtout ici un risque de sélection des bactéries du fait de la technique de prélèvement choisie et, *a fortiori*, un risque de mauvaise représentativité de l'échantillon d'air par rapport à la réalité de la contamination de l'air, si certaines légionelles, peu actives métaboliquement, ne peuvent plus être cultivées ou identifiées en hybridation *in situ* par exemple. La proportion réelle de bactéries viables et/ou cultivables dans l'air ne peut donc pas être établie étant donné que cette phase de collecte est susceptible de la modifier. Des résultats obtenus à partir de techniques de biologie moléculaire sont effectivement en faveur d'un défaut de cultivabilité des légionelles après leur passage dans l'air [26]. Ce problème de la survie des légionelles lors du prélèvement d'air constitue probablement l'obstacle principal à la mesure des légionelles dans l'air. Il sera abordé plus en détail par la suite.

Par ailleurs, on sait que les légionelles peuvent être présentes dans l'air sous forme d'amas. Or, selon la méthode de collecte et d'analyse employée, la capacité à les désagréger ne serait pas la même et ainsi elle ne donnerait pas forcément un nombre de colonies bactériennes proportionnel au nombre de bactéries initialement présentes dans l'amas. Les techniques de filtration et d'impingement, du fait qu'elles remettent en suspension les bactéries dans une solution, permettraient de mieux dissocier ces amas [19]. Par contre, avec les appareils basés sur le principe de l'impaction, un ou plusieurs agrégats bactériens peuvent s'impacter au même endroit sur le milieu et ne donner alors naissance qu'à une seule colonie. Ce phénomène d'impaction multiple, plus vraisemblable avec une ambiance chargée, conduit à sous-estimer les concentrations en bactéries dans l'air. Mais les impacteurs à fente et centrifuges ont été proposés pour limiter ce problème puisqu'ils assurent un meilleur balayage du support de collecte par le flux d'air [19].

Lorsque le milieu de collecte est aussi le milieu de culture, comme c'est le cas pour un impacteur, aucune manipulation ne provoque la perte d'agents entre l'échantillonnage et l'analyse. C'est pourquoi c'est avec ce type d'appareil qu'on obtient habituellement les dénombrements les plus élevés. Le choix du milieu de collecte conditionne aussi la technique à utiliser et le résultat de la mesure. Toutefois, lorsqu'ils ont souhaité tester l'efficacité de plusieurs solutions de collecte pour le prélèvement des légionelles de l'air avec un impinger, Hambleton *et al.* [44] ont obtenu des résultats équivalents avec de l'eau distillée, des solutions salées ou des tampons phosphates.

Outre les caractéristiques propres au type de préleveur, les conditions de son utilisation peuvent également être source d'erreurs dans les mesures lors du protocole d'échantillonnage de l'air. Le principal paramètre qui peut alors jouer sur la mesure des légionelles de l'air lors du prélèvement de l'échantillon est la durée d'échantillonnage. Il a une influence sur la représentativité de l'échantillon et sur le résultat obtenu par l'analyse par rapport à la concentration réelle en légionelles. Pour des temps d'échantillonnage trop

longs, les nombres de colonies ou de cellules bactériennes dénombrées n'augmenteraient plus de façon linéaire mais seraient au contraire sous-estimés [24]. Pour expliquer cette observation dans le cas des prélèvements par impaction, on peut évoquer par exemple le problème de l'impaction multiple ou le stress causé par la dessiccation liée au flux d'air au-delà d'une certaine durée d'échantillonnage. C'est pourquoi Lin *et al.* [23] ont cherché à comparer la méthode récente d'impingement centrifuge avec la méthode classique d'impingement pour des prélèvements de longue durée en testant une huile minérale comme milieu récepteur. Quelle que soit la technique, les concentrations mesurées après culture diminuent quand la durée d'échantillonnage augmente et de manière plus importante avec la technique d'impingement classique. Pour ce type d'appareils, la décroissance observée serait due à la remise en suspension des microorganismes lors de prélèvements plus longs [24].

Cet aspect est donc à discuter dans le cas de l'établissement d'un protocole de prélèvement afin de rester représentatif de la réalité, ce qui est d'autant plus vrai dans notre cas, étant donné la fragilité des légionelles. Pour un débit de prélèvement donné, on en déduit qu'il doit exister une gamme à respecter pour le volume prélevé, permettant d'avoir une représentativité optimale de l'échantillon. Seuls des essais préliminaires avant une campagne de mesures de légionelles permettraient de les déterminer en fonction des performances de l'appareil utilisé et des conditions de prélèvement (météo, quantité de légionelles présentes, etc...).

Outre la représentativité, les autres performances essentielles d'un dispositif de prélèvement sont la reproductibilité et la sensibilité pour *Legionella* [19]. La variabilité des mesures ne doit pas masquer les variations des concentrations de l'air, le meilleur appareil sera donc celui qui aura la plus grande capacité à déceler la présence de cette bactérie. Les comparaisons entre les appareils de prélèvement d'air restent rares en matière de légionelles. Pour étudier la contamination des émissions de tours aéroréfrigérantes industrielles en 2001 (Japon), Ishimatsu *et al.* [45] ont utilisé deux appareils simultanément, à savoir un impacteur à six étages et un impinger. Leurs résultats sont conformes à ceux obtenus par Breiman *et al.* pour le même type d'étude d'aérosols autour de tours aéroréfrigérantes d'immeubles (Etats-Unis) en 1990 [28]. Avec l'impacteur, les dénombrements n'ont été possibles que pour un nombre limité de boîtes de Pétri, certaines d'entre elles étant envahies par des moisissures ou des bactéries d'autres espèces. Par contre, l'impinger a permis d'estimer les concentrations en légionelles dans tous les points de prélèvement testés. D'ailleurs, dans le cas de l'épidémie de Noroxo, une autre société a également réalisé des mesures avec le même type de préleveur que le CSTB, de la famille des impingers. Avec la même technologie plus ou moins bien maîtrisée (impaction centrifuge en milieu liquide), on aboutit à des résultats différents dans une même ambiance.

2.1.3. Récapitulation

Quel que soit le lieu de prélèvement, les incertitudes propres aux techniques d'analyse sont les mêmes pour l'eau et pour l'air. La métrologie des légionelles de l'air comporte un grand nombre d'incertitudes supplémentaires qui sont liées à la méthode d'échantillonnage de l'air. Cependant, dans tous les cas, il a été vu lors de la synthèse bibliographique, que le choix de la méthode d'analyse des légionelles était aussi très important du fait des caractéristiques de chacune en termes de résultats et d'incertitudes. Il est impératif de bien choisir la méthode adaptée en fonction de l'objectif de la campagne de mesures et de prendre en compte des facteurs susceptibles de faire varier le résultat, à savoir le milieu de collecte des particules et les conditions d'analyse des légionelles, mais aussi les conditions de conservation et le transport des échantillons.

Toutefois, ces erreurs susceptibles d'affecter l'efficacité et la qualité du prélèvement d'air ne doivent pas masquer les incertitudes liées à la méthode d'analyse des légionelles, que ce soit dans l'eau ou dans l'air. On a en effet trop souvent tendance à croire que l'analyse de l'eau est totalement maîtrisée. Or, il faut garder à l'esprit que la méthode normalisée

par culture n'est pas adaptée aux eaux brutes. D'autre part, les autres techniques à notre disposition pour l'analyse de l'eau sont les mêmes que pour l'air avec toujours le même souci de la signification des résultats au regard du risque sanitaire à partir de résultats en termes de bactéries totales, cultivables, viables...

Par ailleurs la question de la pertinence d'une analyse réalisée sur de l'eau froide peut aussi être posée. En effet, l'obtention d'un résultat négatif lors de mise en culture d'eau froide ne signifie pas forcément que cette eau ne contient pas de *Legionella*. Plus de 99 % des *Legionella* présentes dans un échantillon sont viables mais non cultivables, notamment au niveau d'une eau de surface et/ou froide. Ces bactéries semblaient donc incapables de se multiplier, mais les auteurs ont mis en évidence le fait qu'un réchauffage à 45 °C leur permettait de retrouver cette capacité [11].

Si l'on souhaite réaliser des mesures de concentrations en légionelles dans l'air, on retiendra que l'on se heurte à des incertitudes à plusieurs niveaux par rapport à la réalité de la contamination de l'air. En premier lieu, la quantité limitée d'air prélevé en fonction de la durée d'échantillonnage n'est pas forcément représentative du volume d'air total auquel sont exposées les populations dans l'environnement. Ensuite, la sélection des bactéries par l'appareil de prélèvement entraîne une erreur sur la quantité de bactéries récoltées dans cet air échantillonné par rapport aux bactéries présentes dans l'ambiance réelle. A ces deux points d'incertitudes s'ajoutent le problème de la « qualité » des bactéries prélevées par rapport à celles des bactéries de l'air ; on rejoint là la question de la survie liée non seulement aux conditions de prélèvement mais aussi directement aux conditions de l'aérosolisation. Enfin, suivant la méthode choisie pour l'analyse des bactéries prélevées, le résultat donné amène alors d'autres incertitudes sur la quantité et l'état des bactéries détectées par rapport à la réalité dans l'air ambiant. On peut donc se demander quelle est vraiment la représentativité globale d'une mesure de concentrations en légionelles sur un échantillon d'air par rapport à la contamination réelle de l'air.

2.2. Retour d'expérience des investigations autour de l'usine de Noroxo en termes de métrologie

2.2.1. Analyse de la stratégie adoptée

Une véritable estimation quantitative de l'exposition par la métrologie nécessite la conception d'un échantillonnage adapté à travers une étude préliminaire qui permet de connaître les caractéristiques de variabilité spatiale et temporelle. Le plan de pré-échantillonnage permettant de déterminer les points d'intérêt autour des aéroréfrigérants et en périphérie semble indispensable pour orienter la suite de la campagne. Concernant ce plan d'échantillonnage, le choix de points de prélèvements à la source, à différentes distances en périphérie de la source sous les vents dominants et en amont de la source par rapport au vent (« bruit de fond ») semble être le plus pertinent en matière de dispersion du panache et donc d'exposition des populations. Il est donc justifié de conserver cette stratégie d'échantillonnage employée dans le cas de Noroxo pour la campagne sur le site de Chinon.

Pour cela, le choix de l'emplacement des points de prélèvement à investiguer en priorité peut être orienté grâce aux résultats de la modélisation de la dispersion du panache réalisée par le département R&D d'EDF. Il semble judicieux de faire appel pour cette approche à un modèle prenant en compte les situations atmosphériques comme il en a été présenté précédemment. Il est possible d'y avoir recours à la fois pour les points éloignés de la source situés à l'intérieur du site (plusieurs km de distance) et aussi dans l'environnement du site. En effet, les résultats de la modélisation de la dispersion permettraient de vérifier si le positionnement des points de surveillance de l'environnement d'EDF sont localisés de manière pertinente, au regard de la réalité de l'exposition des populations.

Par ailleurs, au vu de la bibliographie, la technique adoptée par le CSTB pour la collecte des légionelles dans les aérosols apparaît être la meilleure option à retenir pour la mesure

dans les aérosols de l'exposition des populations aux légionelles. Le type de biocollecteur (impinger) paraît être la solution de choix pour les légionelles en l'état actuel de l'art. Il a en plus un diamètre aérodynamique réglé de manière à optimiser le recueil des légionelles en fonction de leur taille (0,9 μm). On peut donc espérer avoir une récolte des légionelles optimale comparée à ce qui est disponible actuellement.

Ensuite, cela dépend du volume prélevé. Or, le débit de sortie du panache de la tour de Chinon est estimé à 1 800 m^3 d'air pour une tulipe (soit un motoventilateur) de la tour, ce qui donne 32 400 m^3 d'air/s pour l'ensemble d'une tour (18 tulipes). Pendant la durée du prélèvement (40 min), il sort donc environ 78 millions de m^3 d'air d'une tour aéroréfrigérante de Chinon. Le volume de prélèvement obtenu à un débit de 1 m^3/min , soit 40 m^3 , correspond donc à environ $1 / 2.10^6$ du volume du panache sortant de la tour. Au premier abord, le volume échantillonné ne semble pas représentatif de ce qui se disperse dans l'environnement. Mais si on met cette observation en parallèle avec les conditions de l'analyse dans l'eau, on peut noter que le prélèvement d'1 litre nécessaire à l'analyse de l'eau de la tour par la norme AFNOR n'est probablement pas plus représentatif de l'ensemble du bassin froid.

En outre, le CSTB met en parallèle plusieurs types d'analyse de légionelles pour disposer d'un panel de résultats permettant une approche multiple de la composition de l'aérosol en vue d'une interprétation au niveau sanitaire. De plus, les résultats positifs obtenus sur le site de Noroxo laissent espérer une pareille efficacité sur le site de Chinon.

Même si les concentrations dans l'environnement estimées par la modélisation de la dispersion du panache sont faibles, il est possible d'observer des résultats positifs même à distance de la tour. En effet, d'après d'autres résultats de la R&D pour la centrale de Chinon, le niveau d'exposition maximum obtenu à la distance de 250 m de la tour par exemple est de 0,27 UFC/ m^3 sur une heure. Cela correspondrait à l'ordre de grandeur de la limite de détection de la technique de culture considérée pour des échantillons bruts, ce qui serait détectable en théorie.

Dans le cas de l'épidémie du Pas-de-Calais, le CSTB a bien retrouvé des légionelles cultivables à 270 m de la lagune source, mais d'environ 330 UFC/ m^3 . Cela correspond donc à des niveaux de concentration mille fois supérieurs à ceux estimés ici. En pratique, il va donc être difficile d'observer des concentrations en légionelles à cette distance, d'autant plus si elles sont en fait inférieures à celles estimées par la modélisation *a priori* plutôt maximisante. Par contre, si on s'éloigne encore, à 3 km, il ne resterait que $2,7.10^{-3}$ UFC/ m^3 d'après les calculs de dispersion décrits précédemment. Or, pour Chinon, que l'on trouve à un moment donné une concentration en légionelles de $2,7.10^{-3}$ UFC/ m^3 à 3 km de la centrale, signifie en fait qu'on peut trouver à cet endroit et à ce moment une légionelle pour environ 370 m^3 d'air. Cela correspond à un volume dix fois plus grand que le maximum prélevé par le CSTB, donc on a peu de chance statistiquement d'observer un résultat positif à cette distance. Cette concentration moyenne donnée par les calculs de modélisation pour une période donnée en un point donné n'exclut bien évidemment pas de fortes variations temporelles sur cette période.

Il n'y a donc que par la technique de biologie moléculaire que l'on peut espérer avoir un résultat positif, puisqu'une seule légionelle suffit en théorie pour qu'il y ait détection. Mais il faudrait pour cela prélever des volumes considérables pour être sûr d'observer quelque événement dans l'environnement, ce qui paraît incompatible avec la technique de prélèvement utilisée par le CSTB dont les volumes prélevés ne dépassent pas 40 m^3 . Les volumes échantillonnés pour l'épidémie du Pas-de-Calais s'évaluaient en effet environ de 24 à 36 m^3 .

Pour un volume donné, lors du mesurage des légionelles de l'air, on est confronté au choix entre de courtes durées de prélèvement, ne permettant pas de détecter de faibles concentrations, ou de longues durées susceptibles de léser les bactéries ou de favoriser un envahissement des milieux par d'autres espèces. Les auteurs Breiman *et al.* [28] et Ishimatsu *et al.* [45], qui ont déjà effectué des mesures de légionelles dans l'air autour de tours aéroréfrigérantes, ont échantillonné pour cela des volumes de 240 et 600 litres,

avec un impinger, et ont obtenu respectivement des concentrations dans l'air de 2 300 UFC/m³ et de 90 UFC/m³ (pour des concentrations dans l'eau de l'ordre de 10⁷ et 10⁶ UFC/m³). Ces volumes correspondent à des durées de quelques minutes à quelques heures selon le débit de prélèvement utilisé. Une alternative consisterait à regrouper les échantillons obtenus avec plusieurs appareils prélevant l'air en parallèle, ce qui permet d'augmenter le volume d'échantillonnage équivalent pour une même courte durée de prélèvement [19]. Mais cela semble fastidieux étant donné la configuration des grandes tours industrielles en centrales. Ces volumes prélevés sont faibles comparés à ceux du CSTB. Ces volumes ont abouti à des concentrations mesurées plus élevées. En pratique, il n'est pourtant pas possible de réduire les volumes prélevés dans le panache des tours. On a vu en effet que les volumes prélevés ne représentaient déjà qu'un faible pourcentage de la totalité s'échappant de la tour. Par contre, au niveau de la durée d'échantillonnage, elle reste inférieure à une heure lors de la campagne du CSTB, donc cela reste acceptable.

En s'éloignant de la tour, on trouve donc des gammes de concentration incompatibles avec les volumes de prélèvement accessibles et avec les limites de détection des méthodes d'analyse employées, en particulier par culture. Il serait peut-être plus judicieux de prévoir des mesures de légionelles dans l'air uniquement à la sortie du panache et dans un environnement proche de la tour (< 250 m). On peut penser effectivement qu'à 250 m on ne décèlerait pas grand-chose, à moins d'avoir une concentration dans l'eau supérieure et une efficacité moindre du séparateur de gouttelettes bien entendu.

Enfin, la méthode FISH est censée détecter la présence d'une bactérie, dès lors qu'une seule bactérie ayant conservé son intégrité membranaire est présente. Mais on a vu que les bactéries dans l'air risquaient d'être peu actives. L'idée de coupler toutes ces méthodes de mesure est donc sûrement la meilleure solution actuellement pour être sûr d'obtenir des données métrologiques exploitables en matière d'exposition des populations et de risque sanitaire. Ce choix implique la mise en place de moyens importants mais elle permet de s'assurer qu'on ciblera toutes les formes de légionelles existantes susceptibles d'être présentes avec les différents types de résultats obtenus de cette manière. Tant qu'on ne peut affirmer scientifiquement quelles sont les légionelles dangereuses pour la santé humaine, il est en effet préférable de disposer du nombre de légionelles viables, cultivables et d'avoir les résultats en PCR pour obtenir un résultat même en présence de bactéries mortes. Il peut être intéressant quand même de préconiser cette analyse en plus des autres à l'avenir, au cas où les résultats s'avèreraient négatifs avec les autres méthodes, même avec la FISH. Dans ce cas alors, les résultats par PCR permettent de vérifier l'absence totale ou la présence de légionelles mais sous forme dormante et/ou non cultivable dans l'échantillon, même si elles sont probablement non pathogènes. De surcroît, la PCR est la prochaine méthode qui sera normalisée.

2.2.2. Interprétation des résultats de mesure du CSTB

En préambule, il faut rappeler que la méthodologie du CSTB, bien que pratiquée avec le maximum de rigueur scientifique, était employée pour la première fois dans l'environnement extérieur et qu'aucune validation inter-laboratoire n'a été encore pratiquée en dehors des essais comparatifs réalisés par les deux équipes impliquées (INSERM/CSTB). De plus, la littérature scientifique, relative à la détermination de niveaux de concentration des légionelles aéroportées dans l'environnement, leur survie et le mode d'exposition (relation dose-effet), est quasi inexistante. Ainsi, ne disposant d'aucun référentiel, il n'est possible de réaliser qu'une analyse descriptive des mesures.

Des prélèvements de légionelles dans l'air ont été réalisés au niveau de tours aéro-réfrigérantes et de lagunages aérés. Ils ont permis d'évaluer la concentration d'aérosols de légionelles et d'isoler la souche épidémique. Des résultats positifs ont été obtenus quelle que soit la méthode d'analyse considérée. Cela montre qu'on a pu mettre en évidence des concentrations supérieures à la limite de détection de chaque méthode et ce, malgré les difficultés d'échantillonnage susceptibles de sous-estimer la quantité de

légionelles présentes. Ainsi, on dispose d'une vision sous plusieurs angles de la composition de l'aérosol en légionelles cultivables, viables et totales. Il ne manque que les résultats par PCR qui donneraient des informations supplémentaires sur les bactéries « fantômes », pas forcément utiles au niveau sanitaire pour évaluer l'exposition dès lors que l'on a des résultats positifs en terme de bactéries viables et cultivables.

Les différents types de résultats obtenus, outre l'estimation de l'exposition, permettent également d'essayer d'expliquer le comportement des légionelles dans les aérosols. Ainsi, pour le Dr Robine, les résultats observés sur le site de Noroxo suscitent différentes hypothèses. On peut tout d'abord imaginer que les aérosols de légionelles formés étaient encapsulés par les composés rencontrés dans la lagune. Cette « micro-encapsulation » protectrice aurait alors très certainement limité le stress bactérien lié à l'aérosolisation. L'ensoleillement (rayonnements ultraviolets) constaté lors du prélèvement au niveau de la lagune, habituellement néfaste pour les bioaérosols, n'a, semble-t-il, pas altéré la viabilité de ces germes. Ce phénomène conforterait l'idée de l'existence d'une « coque protectrice ». Toutefois, une résistance spécifique et accrue de la souche isolée dans l'air pourrait également expliquer les résultats obtenus. Les premiers examens ont montré qu'il s'agissait en grande majorité de *Legionella Pneumophila* séro-groupe 1. Des tests complémentaires, avec notamment l'aérosolisation contrôlée en laboratoire de cette souche, pourraient très certainement nous éclairer sur cette éventualité. Ces observations montrent que les légionelles peuvent survivre dans l'air malgré les conditions difficiles évoquées précédemment. L'interprétation des résultats obtenus montre également l'intérêt de ce type de données pour comprendre l'aérosol qui s'échappe des tours aéroréfrigérantes.

Par ailleurs, malgré le suivi et la décontamination hebdomadaire des tours expertisées dans les autres entreprises, des aérosols de légionelles sont encore mesurés dans les panaches. Cette présence notable de *Legionella* et autres souches cultivables montre les limites des traitements de décontamination opérés aujourd'hui dans l'eau des tours. Ces traitements n'éliminent pas toutes les légionelles présentes dans l'eau des tours et ces résultats confirment que les légionelles restantes passent toujours dans les panaches malgré ces traitements.

Dans la pratique, les premiers mesurages de légionelles dans l'air extérieur apparaissent recevables pour l'ensemble des experts ayant suivi le dossier et la recherche de solutions analytiques complémentaires à la méthode traditionnelle doit être poursuivie et consolidée, avec notamment des mesures comparatives entre techniques par culture, FISH et PCR. Finalement, on voit ici que cette démarche de métrologie des légionelles est effectivement réalisable et efficace. La source d'incertitude majeure sur les résultats de mesurage des aérosols provient de l'échantillonnage lui-même, du fait des fluctuations probables de la source dans le temps et l'espace, ce qui confirme les données de la littérature.

2.3. Observations de terrain lors du début de la campagne de mesures sur le site du CNPE de Chinon

Quelle que soit la méthode utilisée, la question de la qualité des mesures de concentrations en polluants revêt une importance capitale. En effet, les teneurs en légionelles des milieux sources et des vecteurs d'exposition, valeurs sur lesquelles repose la quantification de l'exposition humaine, représentent en général les variables qui influencent le plus les résultats de l'évaluation des risques sanitaires. La qualité de la mesure concerne tant l'analyse faite en laboratoire (validité interne) que les procédures d'échantillonnage des milieux environnementaux (représentativité spatiale et temporelle) mises en œuvre sur le terrain. Il faut donc s'assurer que les protocoles envisagés sont effectivement exploitables une fois sur le terrain face aux obstacles et complications inévitables.

En premier lieu, ce protocole expérimental utilisé par le CSTB se heurte, dans le cas de Chinon, à des difficultés techniques dues à l'adaptation nécessaire au terrain, puisque les

conditions de l'usine sont évidemment très différentes des conditions de laboratoire dans lesquelles le procédé a été mis au point. Ce décalage est l'aspect qui ressort le plus parmi les faits observés.

Au commencement de cette campagne de mesures, une visite sur le site a permis d'observer les aspects techniques spécifiques aux centrales nucléaires, en particulier le fonctionnement et la spécificité des aéroréfrigérants, ainsi que d'envisager les points de prélèvement accessibles sur le site. Au cours de cette visite, nous avons pu découvrir les techniques de prélèvement de l'air et les méthodes d'analyse des légionelles et discuter de la démarche adoptée avec l'équipe du Docteur Enric Robine.

Ainsi, il est possible de se rendre compte de la difficulté d'appliquer un tel protocole avec les contraintes réelles sur le site de la centrale. Les conditions de travail pour Noroxo étaient déjà délicates, mais, à Chinon, on note ici évidemment des difficultés supplémentaires liées à l'instrumentation des tours en particulier, du fait de leur dimension et de leur structure. Il y a donc des contraintes générales liées à la conception des aéroréfrigérants, où l'installation et la manipulation du matériel sont complexes. Mais aussi, les mesures à Chinon se déroulent avec les aéroréfrigérants en fonctionnement, ce qui complique encore le travail. La présence de légionelles dans l'aéroréfrigérant nécessite le port de masques panoramiques de protection microbiologique qui gêne l'expérimentation.

Mais les contraintes les plus pénibles sont sans doute celles liées directement à l'échantillonnage. A titre d'exemple, la collecte des bactéries aéroportées est réalisée à l'aide du préleveur de type cyclone muni d'une perche de 4 mètres. L'encombrement et le poids du dispositif empêche une mobilité totale à l'intérieur des aéroréfrigérants ; ce dernier a donc été disposé dans l'ilôt central sur les passerelles et en hauteur (Annexe 10). Cet emplacement permet d'être à l'abri de l'humidité et permet d'avoir une alimentation électrique. Par contre, il limite le rayon d'action sous les moto-ventilateurs à 4 mètres maximum. Il est nécessaire d'adapter le protocole en conséquence. L'idéal serait évidemment de pouvoir construire des modules étanches qui permettraient d'aller avec le dispositif actuel directement sous les motoventilateurs par les passerelles de circulation et ainsi de réaliser des prélèvements au plus près de la zone de formation du panache (Annexe 11). Les spécificités du terrain peuvent donc nuire à la représentativité de l'échantillon prélevé. Le passage du flux dans la perche, surtout, influence la qualité du prélèvement. Il serait bon de pouvoir prélever directement dans le panache.

De la même manière, les prélèvements au-dessus des motoventilateurs par l'intermédiaire de l'échafaudage semblent techniquement difficiles et dangereux. De surcroît, ils ne présentent pas forcément un grand intérêt puisque des prélèvements sous les ventilateurs semblent pouvoir être effectués. Il faut se cantonner à des conditions expérimentales dans les limites de faisabilité et de sécurité acceptables. Par conséquent, ces prélèvements ne seront peut-être pas réalisés.

Pour information, selon le Dr Enric Robine, la réalisation d'un point de mesure, lors des investigations relatives à l'épidémie en région Nord, a mobilisé trois agents du CSTB pendant une demi-journée sur une tour accessible. Cette intervention comprenait l'instrumentation de la tour, la collecte des aérosols, l'acquisition des données météorologiques. De plus, au laboratoire du CSTB, le temps d'analyse d'un tel prélèvement (réalisé en duplicata) mobilise deux agents durant une semaine.

On peut donc comparer approximativement avec les moyens mobilisés à Chinon mentionnés précédemment. Dans le cas du site de Chinon, plusieurs mois sont nécessaires, notamment à la réalisation d'une telle démarche complète, puisque de nombreux points de mesures sont nécessaires notamment en phase de pré-échantillonnage.

Pour l'ensemble des manipulations sur site, quatre personnes sont mobilisées à Chinon et deux agents supplémentaires également au laboratoire du CSTB. Au final, ce sont des moyens considérables nécessaires à cette campagne à Chinon et on peut penser que ces moyens seraient encore plus importants pour les autres centrales aux tours

aéroréfrigérantes plus hautes. Finalement, les moyens matériels et humains requis dans ce type de démarche sont bien plus conséquents que ceux nécessaires à la réalisation de mesures de légionelles dans l'eau du fait de la difficulté d'instrumentation pour l'échantillonnage sur les tours essentiellement. La question est désormais de savoir si cet investissement est réaliste et raisonnable au regard de l'apport au niveau sanitaire.

Pour finir, outre les exigences du terrain, il faut également se soumettre aux contraintes de fonctionnement des infrastructures. Dans notre cas, des traitements de l'eau des tours peuvent être effectués dans les centrales. C'est le cas notamment à Chinon où des chlорations massives sont prévues d'ici peu de temps. Toutefois, ces traitements ne semblent pas contradictoires avec la poursuite de la campagne. D'après les observations faites en ce sens pour Noroxo, des teneurs en légionelles devraient encore être mesurées dans les aérosols malgré la diminution des concentrations dans l'eau. Ces mesures pendant les phases de traitement pourront montrer, dans le cas particulier de Chinon, s'il y a un effet sur la composition microbiologique du panache et donc sur l'exposition des populations.

2.4. Utilité et limites d'un projet d'étude sur circuit-pilote pour estimer l'exposition des populations aux légionelles issues des panaches

D'après la proposition décrite précédemment, cette autre forme d'étude faisant appel à une plate-forme d'essais pourrait s'avérer utile pour aider à répondre à notre problématique d'évaluation du risque légionelles. Elle mettrait en jeu la métrologie des légionelles dans les aérosols. Cependant, la question du prélèvement ne se pose pas dans ce cas. On est toujours confronté aux incertitudes liées à l'analyse des légionelles mais plus à celles qui pèsent sur l'échantillonnage de l'air. Il n'y a en effet pas de dispersion du panache s'échappant de l'aéroréfrigérant pilote. Les prélèvements sont possibles uniquement à la source émettrice de légionelles et non pas à la périphérie du pilote. Mais ce n'est pas vraiment un problème, puisqu'on se pose la question de l'utilité des prélèvements dans l'environnement même dans des conditions réelles.

Par contre, en principe, avec l'adaptation technique proposée, on récupère plus facilement tout ce qui sort de la tour. Cela peut être un bon moyen de pouvoir caractériser la fonction de transfert des légionelles de l'eau du circuit vers l'air grâce à des mesures dans le panache récupéré et dans l'eau circulante, mettant en parallèle plusieurs techniques d'analyse comme lors des campagnes sur site du CSTB. Ainsi, on n'a plus à faire face au problème de représentativité du volume prélevé, puisque la totalité du panache est récupérable. On est aussi moins confronté aux contraintes matérielles du terrain que lors de mesures sur l'aéroréfrigérant réel.

D'un autre côté, les pilotes ne sont pas par définition dans des conditions de fonctionnement à l'échelle réelle. Ils n'ont donc pas pour objet d'évaluer directement l'exposition des populations. On n'a bien entendu pas suffisamment d'information pour estimer la contamination de l'air suite à la dispersion des panaches. Les données scientifiques issues des pilotes ne peuvent toutefois pas remplacer les mesures à la source dans les aérosols, qui sont forcément plus représentatives de la contamination réelle. L'intérêt de l'utilisation d'un pilote se situe plutôt en complément des mesures sur les aéroréfrigérants réels et de la démarche d'évaluation des risques par modélisation pour obtenir la concentration sur le lieu d'exposition. L'avantage de cette expérimentation serait de pouvoir ensuite utiliser le taux de transfert eau-air obtenu dans les calculs de modélisation à partir de la concentration mesurée dans l'eau, dans le but d'affiner les hypothèses sur l'estimation des expositions. Cela permet de connaître le terme source et de caler la modélisation dessus.

3. CONSÉQUENCES DE L'UTILISATION DE LA MODÉLISATION DE LA DISPERSION DES LÉGIONELLES POUR L'ÉVALUATION DU RISQUE

Dans le cadre d'une démarche d'évaluation des risques et devant la difficulté d'obtenir des résultats d'analyse microbiologique fiables et reproductibles, se pose la question de l'utilisation de modèles de dispersion pour estimer les concentrations à distance des sites. En particulier, dans une optique de caractérisation de l'exposition de la population résidant autour des centrales, il est utile d'avoir recours à des modèles validés de prédiction de concentrations en bioaérosols autour d'une source telle qu'une tour aéroréfrigérante. Les variables qui interviennent entre autres sont la concentration à la source, le volume d'émission (m^3/s), la vitesse moyenne du vent, les déviations standard de l'étendue horizontale et verticale du panache qui sont fonction de la distance sous le vent et de la stabilité de l'atmosphère, de la hauteur du panache, de la proportion de particules microbiennes de chaque taille et de la vitesse de dépôt des gouttelettes microbiennes pour chaque taille de particules. A ces modèles ont été parfois rajoutés, pour les particules viables, des paramètres liés à la survie [18].

Mais, la modélisation de l'exposition humaine doit inciter à une grande prudence. Ces modèles complexes reposent sur des observations expérimentales souvent partielles et éloignées des conditions réelles, sur des simplifications et des hypothèses.

Dans le cas de l'estimation de la dispersion aérienne de légionelles viables à partir d'une tour aéroréfrigérante, les difficultés rencontrées proviennent de la détermination des facteurs biologiques tels que le taux de survie des légionelles dans l'air encore inconnu, mais aussi la détermination du terme source, à savoir l'eau ou l'air. Il est nécessaire de réaliser préalablement un calage de la modélisation sur le terme source, que l'on n'est pas en mesure de faire correctement à l'heure actuelle. On a en effet vu que le travail mené par le département R&D prenait en compte des hypothèses plutôt majorantes au premier abord, en particulier concernant le transfert des légionelles de l'eau vers l'air considéré comme total. Les résultats en termes de contamination de l'air par le panache dispersé peuvent donc être surestimés par rapport à la réalité.

Il faut savoir cependant qu'il peut se produire une recontamination entre l'eau et l'air lors du passage dans le séparateur de gouttelettes (biofilm). La présence de biofilm dans des composants des tours (parois internes, packings, séparateur de gouttelettes) et les vitesses considérables de l'air au niveau de ces équipements laissent supposer un transfert biofilm/air. Ainsi, l'arrachage et l'entraînement ascendant du biofilm pourraient constituer une source secondaire de légionelles entre l'eau des tours et l'air. On pourrait dans ce cas trouver plus de légionelles dans l'air que dans l'eau et la modélisation tendrait alors plutôt à sous-estimer les résultats.

Il faut noter que la modélisation est susceptible de maximiser les résultats de l'évaluation des expositions du fait :

- Du plafonnement du panache à une altitude faible pour ce qui est des grandes tours aéroréfrigérantes des autres centrales que Chinon
- De la prise en compte d'une activité nominale des centrales sur toute l'année
- De la prise en compte d'une survie des légionelles égale à 100 %.

Ce dernier critère est particulièrement valable pour les aéroréfrigérants de grande taille avec des zones de retombée situées à plusieurs kilomètres. Ces longues durées de dispersion du panache entraînent l'assèchement de l'air et un risque de dessiccation pour les légionelles. Elles ont moins de chance de survivre jusqu'au point de retombée du panache lorsque celui-ci est plus éloigné.

La vitesse de dépôt des particules n'est pas prise en compte dans les modèles utilisés actuellement par le département R&D d'EDF. Les hypothèses de la modélisation ne prennent pas en compte non plus le rôle possible des amibes dans la survie des légionelles. Il faut tenir compte de l'ensemble de ces incertitudes sur le résultat obtenu et garder à l'esprit que d'autres incertitudes faussent les résultats, à savoir celles sur la mesure dans l'eau. Les conditions de dispersion des légionelles estimées dans le modèle sont différentes des conditions réelles de dispersion dans l'atmosphère.

De même, les sites concernés et leur métrologie ne doivent pas être trop complexes : relief modéré ne perturbant pas les écoulements de façon systématique, etc. Enfin, ces études s'adressent à des « polluants » ne subissant pas de modifications notables au cours de leur transport sur les sites. Or, le « polluant » considéré ici est constitué de minuscules gouttelettes d'eau de primage chargées en légionelles. Les gouttelettes peuvent s'évaporer et la légionelle n'est alors plus dans un aérosol mais dans l'air directement. Il s'agit donc d'une particule plutôt instable au cours de son transport.

Par ailleurs, il faut signaler que ce type de modèle n'est pas valable pour l'estimation de concentrations à moins de 100 m de la source [18]. D'ailleurs, les résultats de la modélisation retenus par la R&D ne prennent pas en compte ceux obtenus pour des distances inférieures à 250 m de la centrale, bien qu'il soit possible que des expositions plus importantes y surviennent. En effet, l'influence de la structure même des installations à des distances aussi réduites aurait rendu des résultats beaucoup trop incertains d'où des mesures dans l'air pour ces petites distances seraient bien nécessaires. Or, pour Chinon, la dispersion du panache est moins importante et les plus fortes retombées correspondent au périmètre immédiat de la centrale. Il est donc d'autant plus préjudiciable dans le cas de Chinon de ne pouvoir considérer les résultats de modélisation à faible distance. On pourrait envisager des prélèvements dans l'environnement pour comparer et voir s'il y a cohérence entre les deux types de résultats au niveau de la contamination de l'air, tout en gardant à l'esprit les incertitudes qu'engendrent ces mesures éloignées de la source. Ces modèles complexes reposent sur des observations expérimentales éloignées des conditions de terrain, sur des simplifications et des hypothèses. Il s'agit seulement d'ordres de grandeur des concentrations en légionelles dans l'air ambiant. Même si, sur un plan quantitatif, les résultats établis dépendent des hypothèses faites sur le terme source, il n'en demeure pas moins que les résultats fournissent des renseignements intéressants sur le plan qualitatif (probabilité d'absence ou de présence de légionelles). Leurs prédictions sont donc sujettes à discussion. En outre, il est indispensable de connaître la structure et les codes de calcul du logiciel employé pour comprendre la signification des estimations obtenues et au besoin, pour procéder aux corrections et ajustements nécessaires.

Finalement, l'évaluation de l'exposition humaine par modélisation gagne en faisabilité, mais elle introduit d'autant plus d'incertitude dans les résultats finaux de l'évaluation que les données recueillies sont peu représentatives. L'avantage de ce type de démarche est donc de pouvoir connaître la quantité maximale de légionelles sur une échelle de temps donnée susceptibles d'être présentes à une distance donnée, au lieu d'exposition des populations. Pour évaluer l'exposition des populations, cela permet d'obtenir des concentrations estimées inférieures aux plus petites concentrations mesurables par une analyse du fait des limites de détection des techniques. On élimine ainsi le problème de limite de détection de la méthode d'analyse et de représentativité de l'échantillon d'air, puisqu'il n'y a pas d'analyse dans les aérosols dans l'environnement à distance de la source. On est toutefois toujours tributaires des erreurs sur l'analyse de l'eau ou dans les panaches à la source.

C'est donc une alternative commode à la métrologie de la contamination sur le lieu d'exposition ; on en a encore besoin tant que la métrologie dans les aérosols n'est pas au point pour tous les types et lieux de prélèvement, notamment sur le lieu d'exposition.

Si les mesures de l'exposition étaient possibles, il serait envisageable de limiter l'utilisation de cette modélisation plutôt pour orienter les plans d'échantillonnage lors de campagne de mesure que pour estimer l'exposition. La modélisation n'est pas idéale. Cependant, ce type de démarche est actuellement le seul reconnu et préconisé pour les études relatives à l'impact sanitaire d'installations industrielles. Il n'avait jamais été fait de mesures dans l'air dans un but d'évaluer le risque lié aux légionelles issues des tours aérorefrigérantes avant l'épisode de Noroxo. De plus, les calculs seraient réalistes, *a priori*, et basés sur un calage de la dispersion sur des mesures réelles à la source. Ce n'est qu'une modélisation, mais elle permet tout de même de pallier les lacunes engendrées par le manque de fiabilité des mesures dans l'aérosol.

4. PRISE EN COMPTE DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA SURVIE DES LÉGIONELLES DANS LES AÉROSOLS

Dans le cadre d'une évaluation des expositions des populations aux légionelles, la détermination de la contamination du milieu doit tenir compte des facteurs intrinsèques ou extrinsèques susceptibles de modifier les possibilités de l'agent d'être transmis ou d'infecter l'hôte : facteurs de pathogénicité, capacités de résistance aux éléments chimiques et physiques de l'environnement ou de l'hôte, survie dans le milieu considéré. Ici, il faut distinguer deux phases dans le passage des légionelles de l'eau vers l'air. La première est l'aérosolisation : les légionelles contenues dans l'eau des circuits se retrouvent dans l'aérosol, c'est-à-dire au sein des gouttelettes en suspension dans l'air. Puis les gouttelettes s'évaporent lors de la dispersion du panache et les légionelles sont alors dans l'air uniquement. La question de la survie se pose lors de ces deux phases : l'aérosolisation et le passage dans l'air.

Or, contrairement au cas de l'eau, ces aspects restent presque totalement ignorés dans le domaine des bioaérosols. L'étude de la survie des bactéries dans les aérosols est difficile car il faut bien définir ce qu'est un aérosol microbien, connaître les facteurs de l'environnement, maîtriser des techniques de prélèvement et d'identification représentatives de la réalité. Non seulement l'échantillonnage des bioaérosols est susceptible d'être sélectif mais aussi, quelle que soit la technique de mesure des légionelles choisie, on se heurte à un manque de connaissance sur l'état physiologique des bactéries de l'air. Il est en effet probable que le séjour dans l'air d'une bactérie soit une situation stressante pour elle et remette en cause sa survie, sa capacité à se multiplier ou son pouvoir pathogène [19]. Ainsi, si on ne tient pas compte de ces paramètres dans l'évaluation de la dispersion des panaches potentiellement contaminés, l'étape d'estimation de l'aérobioccontamination à partir du terme source tend donc plutôt vers une surestimation de celle-ci.

Outre la sensibilité des personnes exposées, le caractère infectieux des aérosols est en effet quant à lui lié à différents paramètres [46] : les caractéristiques des aérosols, dont la taille des gouttelettes, la concentration en légionelles et la survie des *Legionella* dans ces aérosols. Selon Dennis *et al.* [47], ce sont les souches les plus virulentes qui survivent le plus longtemps après aérosolisation. Ainsi, *Legionella pneumophila* séro groupe 1 aurait une capacité de survie supérieure. La survie dans les aérosols serait donc un important facteur de leur virulence.

La stabilité des gouttelettes d'aérosols est aussi un facteur à prendre en compte. Cette stabilité dépend des conditions atmosphériques, en particulier de la température et de l'humidité relative de l'environnement dans lequel se développe cet aérosol. Dennis *et al.* [47] ont déterminé qu'une meilleure survie des légionelles aérosolisées était constatée à une température de 20 °C et à une humidité relative de 60 %. La stabilité des légionelles aérosolisées dépend aussi de la pression partielle en oxygène [32]. Les aérosols évolueraient dans le temps et les gouttelettes les composant ne garderaient pas une taille constante durant tout leur parcours. Les légionelles dans le panache sont susceptibles de se retrouver directement en suspension dans l'air au bout d'une certaine distance de l'émission de l'aérosol. La taille des gouttes est un facteur significatif de la survie des bactéries, la décroissance de la taille des gouttes étant corrélée à la diminution de la survie [48]. Le devenir des légionelles hydratées dans les gouttelettes est donc différent de celui des légionelles sèches. D'après les expériences de Katz et Hammel, les *Legionella pneumophila* se montrent vulnérables à la dessiccation [49]. Les auteurs en concluent qu'elles ne doivent probablement pas exister dans un habitat non hydrique et seront difficiles à cultiver à partir de matières sèches.

La vitesse de sédimentation des bactéries est aussi un facteur à prendre en compte, mais n'empêche pas leur transport sur de longues distances par rapport au lieu d'aérosolisation. Ainsi, des bactéries en suspension dans l'air pourraient parcourir une distance de plusieurs kilomètres [46]. Toutefois, Bhopal *et al.* démontrent que les aérosols infectieux, ceux contenant des légionelles en particulier, sont transportés sur de plus courtes distances, quelques centaines de mètres environ [50]. Selon Heidelberg *et al.*

[32], la plupart des bactéries aérosolisées restent viables au moins quatre heures après aérosolisation et peut-être même plus longtemps.

On sait, d'après les résultats de modélisation de la dispersion du panache, que les retombées maximales sont situées en moyenne entre 3 et 8 km pour les aérorefrigérants de grande taille, cela correspond à un temps de transport variant de 10 à 30 minutes. Or, l'étude de Berendt [51] sur les aérosols de légionelles montre des taux de survie à 30 minutes variant de 1 à 10 % en fonction de l'humidité relative. La situation est intermédiaire sur le site de Chinon où la zone de retombée maximale du panache est située dans le périmètre du site, mais les premiers villages se situent à une distance de 3 km. Le délai de retombée est donc suffisamment important après émission du panache de la tour pour considérer un taux de survie des légionelles inférieur à 100 % dans le panache.

Dans des conditions de laboratoire, la survie des légionelles dans les aérosols est finalement fonction à la fois de la souche elle-même mais aussi des conditions environnementales. Ainsi, en considérant une survie des légionelles à 100 % lors de la dispersion du panache, la modélisation peut être majorante. Mais il suffit de la présence d'amibes ou d'un morceau de biofilm comme source de légionelles, pour que la concentration soit même supérieure dans l'air à celle dans l'eau. Il y a encore d'autres paramètres influant sur la survie des légionelles. Dans l'air, les bactéries peuvent en effet être sous forme libre ou agrégée sur des particules organiques ou minérales. Dans le premier cas, les bactéries seraient particulièrement vulnérables à la dessiccation et auraient peu de chance de survie. La plupart des bactéries conservant un potentiel infectieux seraient donc agglomérées à de grosses particules [19]. On note donc ici l'intérêt d'une méthode d'échantillonnage de l'air, permettant la dissociation des amas bactériens comme l'impingement que le CSTB utilise pour sa campagne de mesures.

Pour conclure, la survie des légionelles dans un aérosol est fonction de différents facteurs (la souche, la stabilité de l'aérosol, la présence de rayons ultraviolets, la température, l'humidité relative), mais il n'est pas exclu que la protection physique par d'autres microorganismes (comme les amibes) puisse améliorer leur survie.

Si on rapporte ces observations à notre situation, on ne sait pas à quelle souche on est confronté dans les panaches des centrales. Par conséquent, le besoin de sérotypage par le CNRL se fait ressentir et il serait intéressant d'observer les résultats sur les prélèvements qui seront effectués à Chinon. Les autres paramètres sont variables sur le site de Chinon et on note ici l'intérêt d'effectuer des mesures de jour et de nuit, de repérer les conditions météorologiques lors des prélèvements et d'effectuer l'analyse d'autres microorganismes en parallèle (amibes par exemple), afin de permettre une meilleure interprétation des résultats d'analyse des légionelles dans les aérosols.

Les travaux sur la survie des légionelles dans les aérosols sont peu nombreux et anciens ; il faut donc attendre les résultats des nouvelles études en cours, en particulier les travaux de recherche sur la survie des légionelles dans les aérosols menés par le CSTB et le département R&D d'EDF. Les résultats de cette étude ne sont pas encore disponibles (septembre 2004). Ils apporteront sans doute des précisions utiles à notre problématique. Mais il semble d'ores et déjà qu'ils rejoignent les observations déjà faites dans la littérature existante sur les différents paramètres influents.

Cette étude se décompose en deux phases [52]. La première phase terminée a abouti à la mise au point d'une chambre expérimentale d'aérosolisation sécurisée, développée pour simuler un bioaérosol stable, reproductible et contrôlable. Elle a pour but d'étudier la fonction de transfert des *Legionella pneumophila* en milieu aqueux vers les aérosols et la survie des légionelles aérosolisées dans différentes conditions environnementales bien maîtrisées (humidité, température et rayonnement). Contrairement aux études menées jusqu'à aujourd'hui, la mise en culture n'est pas le seul moyen de recherche des légionelles. Ces équipes mettent à profit la reconnaissance de l'intégrité membranaire (FISH). Cependant, ce type de résultats est toujours obtenu dans des conditions de

laboratoire différentes des conditions réelles ; il faut donc rester prudent dans l'extrapolation à la réalité du panache.

Enfin, les études présentées concernent toujours la survie des légionelles dans les aérosols et non dans l'air. Or, lors de la dispersion du panache dans l'atmosphère, les légionelles se retrouvent rapidement en suspension dans l'air directement. La survie des légionelles apparaissant déjà incertaine dans les aérosols, elle semble donc encore plus compromise lorsque l'évaporation des gouttelettes de l'aérosol survient. Cette question de la survie des légionelles dans l'air est donc d'autant plus à prendre en considération dans la modélisation des concentrations sur le lieu d'exposition qu'elle aurait un impact plus important avec l'éloignement du panache par rapport à la source. Par conséquent, d'autres études de la survie des légionelles dans l'air seraient utiles pour répondre à notre problématique. La survie dans les aérosols concerne uniquement les mesures à proximité de la tour et non plus à distance de la tour. Ce type d'étude n'est donc pas suffisant pour déterminer l'intérêt des mesures de légionelles de l'air dans l'environnement, mais uniquement à la source. Une étude en laboratoire sur la dessiccation des légionelles dans l'air serait donc intéressante à envisager.

5. RÉFLEXION SUR L'INTÉRÊT DES MESURES DANS LES AÉROSOLS ET PERSPECTIVES POUR LA SUITE DU PROJET

5.1. Bilan sur l'intérêt des mesures de légionelles dans les aérosols

A l'heure actuelle, le prélèvement d'aérosols pour la recherche des *Legionella* n'est pas réalisé en routine en raison de difficultés métrologiques non encore maîtrisées [12]. Il a été vu dans l'ensemble de ce travail qu'il restait difficile d'estimer le niveau de contamination de l'air notamment pour plusieurs raisons : transfert des légionelles de l'eau vers l'air inconnu, effet stressant des méthodes de prélèvement de l'air, méthodes d'analyse des légionelles de l'air non validées et résultats obtenus valables uniquement à un moment donné, à un endroit précis et pour des conditions météorologiques particulières. En l'absence de mesures sur site ou lorsque les limites de détection des méthodes d'analyse ne permettent pas d'obtenir des informations sur des concentrations faibles, la contamination de l'air peut être obtenue par modélisation. Il a été vu, en effet, d'après l'étude bibliographique, qu'il était nécessaire d'avoir au moins 0,25 UFC/m³ pour espérer obtenir un résultat positif par la méthode de culture. En théorie, les techniques FISH et PCR sont plus sensibles, mais des incertitudes importantes pèsent sur les résultats du fait de l'échantillonnage.

Toutefois, cette approche semble également incertaine car l'importance de la contamination de l'air en légionelles est liée à des phénomènes instantanés relatifs à l'environnement. La présence de légionelles dans l'air dépend en effet de l'existence de sources émettrices, de leur abondance dans celles-ci, des conditions de dispersion et de leur survie. Ces modèles ne sont pas adaptés à la situation et ne peuvent pas faire l'objet de validations suffisantes.

Jusqu'à présent, on ne dispose pas de calage sur le terme source dans l'air, c'est pourquoi on a recours à des mesures de légionelles dans l'eau et à une estimation sur le transfert des légionelles lors du passage de l'eau vers l'air. Leur taux de transfert est assimilé à celui de l'eau (taux de primage). La seule question qui se pose vraiment pour l'utilisation de la modélisation, est de savoir s'il peut y avoir plus de légionelles passant dans l'air à cause d'un enrichissement de l'eau dans le séparateur de gouttelettes. Une sous-estimation de l'exposition serait en effet préjudiciable en évaluation du risque. De plus, la modélisation peut donner des résultats en concentrations à plusieurs km de distance alors que les légionelles sont peut-être mortes durant leur transport. Cela paraît également erroné de donner des résultats en UFC, alors qu'on ne sait pas en effet si les légionelles sont encore viables et encore moins cultivables suite à leur passage dans l'air. La métrologie des légionelles dans l'air trouverait finalement toute sa légitimité au niveau sanitaire dans le cas où on ne dispose pas de la fonction de transfert de l'eau vers l'air

lors de l'aérosolisation, ce qui est le cas de certaines autres sources d'aérosols (lagunes, bains à remous...).

Mais il faut rappeler que la problématique générale en question touche un domaine innovant et que le protocole utilisé n'est qu'un prototype : le CSTB est la seule entité disposant actuellement d'un biocollecteur performant pour ce type de bactéries et de laboratoires de microbiologie compétents pour ce type d'investigations. Il en existe d'autres, mais moins adaptés aux légionelles. Il est préférable d'utiliser en priorité des résultats de mesure pour apprécier la concentration en légionelles dans l'air quand ils sont disponibles et sous réserve qu'ils soient techniquement fiables, ce qui reste encore à démontrer. Au niveau réglementaire, il est nécessaire de continuer les mesures dans l'eau et de continuer les démarches d'évaluation du risque sanitaire actuelles tant qu'aucune normalisation n'a lieu dans le domaine de la recherche des légionelles dans l'air. Par contre, du point de vue sanitaire, les objectifs ne sont pas le respect de la législation mais la protection de la santé publique et il semble logique pour EDF, dans le cadre de sa politique de santé environnementale, de baser sa gestion du risque sur des données qui semblent plus pertinentes au regard de la réalité du risque, sous réserve qu'elles soient valables.

Le but de la réalisation de mesures dans les aérosols est d'apporter de nouvelles données pour avancer dans le projet d'évaluation du risque de légionellose lié aux centrales nucléaires. Il est possible d'intégrer ces résultats dans cette démarche afin d'affiner le calcul de la dose d'exposition et d'arriver à une évaluation de l'exposition des populations plus réaliste, *a priori*, que celle qui était utilisée jusqu'à présent. Mais il est impératif de tenir compte de l'incertitude de ces mesures : une variabilité est forcément induite dans le calcul de la dose d'exposition et du risque du fait de la variabilité des mesures dans les aérosols. L'expérience devrait montrer à l'avenir l'ampleur de cette approximation dans l'estimation du risque sanitaire. Comme pour toute mesure, celle-ci comporte des incertitudes encore accentuées par le caractère exploratoire de la démarche.

La concentration en bioaérosols n'est pas homogène et peut varier de manière importante sur des intervalles de temps réduits à cause de nombreux paramètres environnementaux ou anthropiques. Or, l'inconvénient d'une campagne de mesures est de ne fournir qu'une « photo » de la contamination en légionelles : on obtient une concentration en légionelles à un moment donné avec des conditions météorologiques données et en un lieu précis.

La modélisation donne au contraire une distribution des concentrations en légionelles. Cela semble plus pertinent au niveau sanitaire pour estimer l'exposition, puisqu'on a ainsi plusieurs scénarios d'exposition et les conditions pour lesquelles on peut avoir un maximum de concentration par exemple. Mais on ne maîtrise pas l'influence de la présence d'amibes sur cette distribution de concentrations, ni la pathogénicité des légionelles supposées présentes. Même si on a tendance à faire davantage confiance à des mesures, l'idéal serait de pouvoir en faire un très grand nombre pour obtenir une distribution de la présence de légionelles, ce qui est difficilement réalisable en pratique et relativise donc l'intérêt des mesures.

Enfin, l'accès au mesurage aérien des légionelles devrait permettre, à court terme, d'établir de nouveaux référentiels. Pour l'instant, étant donné qu'on ne dispose d'aucune référence en termes d'épidémie et de mesures dans l'air, l'utilisation des résultats de ces mesures n'est pas aisée. Il serait donc intéressant d'accumuler des données de mesures dans l'air lors d'épidémies et de pouvoir par la suite confronter les résultats de mesures aux données de la surveillance épidémiologique. L'utilisation de la mesure d'aérobiocontamination en *Legionella* est un bon outil dans le cadre d'études épidémiologiques. Cette campagne de mesures est une première voie de progrès et la métrologie dans les aérosols devrait être de plus en plus précise à l'avenir.

5.2. Proposition de méthodologie pour des mesures dans l'air

Si on décide de faire des mesures dans les aérosols à l'avenir, la question est alors de définir la manière de procéder en choisissant la méthodologie de mesure et la stratégie d'échantillonnage. On a vu que les échantillonneurs couramment disponibles ne peuvent pas récolter les bactéries de l'air sans une inactivation ou une perte pendant ou après l'échantillonnage. Le protocole utilisé par le CSTB sur le site de Chinon apparaît le meilleur actuellement au vu de la littérature à la fois en matière d'échantillonnage de l'air et d'analyse des légionelles. Le prélèvement tangentiel sur le liquide de la paroi du support rotatif offre un minimum de traumatisme aux cellules bactériennes : plus d'écrasement par impact direct sur une surface, pas de traumatisme dû aux vitesses importantes ou surpression dans des buses, réduction du choc hygrométrique dans le milieu de collecte et pas de déshydratation des cellules au fur et à mesure du prélèvement. Bien qu'elle ait été conçue, à l'origine, pour l'évaluation de l'aérobiocontamination en atmosphère intérieure, cette nouvelle métrologie permet de détecter les légionelles par l'échantillonnage de grands volumes, directement dans le milieu aérien.

De plus, les caractéristiques des aérosols influent sur le comportement des légionelles et sur leur survie, ce qui justifie d'utiliser un compteur à particules pour comprendre ces phénomènes à partir d'une description des particules présentes dans l'aérosol. Le COP donne la concentration et la taille des particules présentes, afin d'avoir une idée de la stabilité de l'aérosol au cours du temps.

Un autre point est à discuter : le choix de la méthode d'analyse. Pour la méthode normalisée, il peut se trouver des bactéries présentes qu'on ne parvienne pas à cultiver à cause du stress dû à l'échantillonnage ou à l'aérosolisation. Les techniques de mesurage de légionelles disponibles sont des techniques d'analyse dans l'eau. Dans l'air, on détecte peu de légionelles à cause du problème de stress des bactéries pendant l'aérosolisation et de la difficulté de survie des bactéries dans l'air après l'évaporation des gouttelettes. La question de la perte de viabilité ou de cultivabilité se pose.

Pour les autres méthodes dites « rapides », il existe encore de nombreux problèmes pour la quantification et la détermination de la viabilité cellulaire. Par conséquent, ces méthodes ne peuvent pas être utilisées comme méthode de référence. Des techniques moléculaires ou cellulaires seraient pertinentes si le critère de viabilité était associé à la détection spécifique du micro-organisme.

A l'heure actuelle, on ne peut donc pas dire quelle technique est la mieux adaptée aux mesures de légionelles dans les aérosols. Il est possible de faire divers types de mesures mais on ne sait pas ce que les résultats de concentrations en légionelles apportent au niveau du risque sanitaire. Il semble en définitive qu'il n'existe pas de solution « clé en main » permettant la mesure de bactéries dans l'air. A chaque contexte, un travail d'optimisation doit être réalisé intégrant la comparaison de différentes approches de collecte, l'adaptation et ou la mise au point d'un milieu de collecte associé à l'information que l'on recherche et par là même adapté à la population microbienne suivie.

Dans le but de tester une nouvelle approche de la métrologie des aérosols contenant des légionelles, l'équipe du Dr Robine du CSTB, en partenariat avec l'équipe INSERM du Dr Mathieu (faculté de Médecine de Nancy), mène actuellement un projet en vue d'établir un modèle pour l'évaluation du risque au niveau de la caractérisation de l'exposition [53]. Cette étude vise à tester et comparer deux outils pour l'échantillonnage des bioaérosols : l'impacteur à crible sur gélose et l'impinger, ainsi que deux méthodes de détection des *Legionella* aéroportées : la mise en culture (impacteur et impinger) et la FISH (impinger). Les essais ont été pratiqués, à la fois en laboratoire avec utilisation d'une chambre d'aérosolisation et dans un établissement de santé contaminé par les légionelles. Les deux types d'essais ont amené à la conclusion que l'efficacité de l'impinger est nettement meilleure que celle de l'impacteur. Les essais sur le terrain en conditions réelles d'exposition (douches), ont permis de détecter des légionelles dans l'air par la méthode FISH quand les prélèvements étaient effectués par l'impinger (de 10^2 à 10^4 cellules /L),

alors qu'elles n'étaient pas détectées en culture. Par contre, aucune *Legionella* dans l'air n'a été détectée en utilisant la technique par impaction (culture). Il s'agit donc d'un exemple d'étude concluant mettant à profit plusieurs types de mesures des légionelles dans l'air et comparant en parallèle avec des analyses dans l'eau. Cela confirme que ce type de protocole similaire à celui du CSTB pour Chinon est intéressant. Mais un des problèmes dans l'étude d'aérosols est la dispersion dans l'ambiance et la difficulté de maintien de l'aérosol. Par conséquent, cette étude menée en intérieur a été réalisée avec les aérations et ouvertures des salles calfeutrées si besoin, afin de stabiliser artificiellement l'aérosol. Il s'agit donc plutôt de conditions expérimentales que réelles. L'extrapolation à la réalité ne peut pas être automatique. Ce protocole n'a déjà pas été facile à mener à bien dans ce cas, alors on peut imaginer la difficulté de l'appliquer en extérieur.

Par ailleurs, quand on aborde l'exposition de la population avoisinant les centrales, si l'on s'éloigne de la source, la présence de l'agent dans l'air dépend aussi des conditions de dispersion et de la survie des légionelles. Une fois les techniques d'échantillonnage de l'air et d'analyse des légionelles choisies, il est nécessaire de prendre en compte d'autres paramètres dans le protocole de prélèvement dans l'environnement ou dans la suite de la démarche par modélisation : durée d'échantillonnage, pré-échantillonnage pour déterminer les points d'intérêt (variabilité intra et inter), zones de moins forte dispersion du panache, zone de plus forte densité de population exposée. La variation observée en fonction de la durée d'échantillonnage justifie la réalisation d'essais préliminaires avant une campagne de mesures autour d'un aéroréfrigérant, en particulier avec la méthode d'impingement, et ce en plus d'un pré-échantillonnage pour déterminer la localisation des points de prélèvements. Elle permettrait de déterminer le volume et donc la durée optimale d'échantillonnage en fonction de la méthodologie retenue. On a vu en effet qu'il ne fallait pas descendre en dessous d'un certain seuil de volume prélevé car la représentativité par rapport à la totalité du panache ne serait plus assurée.

Dans la recherche de la contamination de l'air, il est nécessaire de prendre en compte la taille de la population exposée aux aérosols et de préciser l'existence de populations sensibles et de scénarios d'exposition. Mais il est souvent difficile de cerner cette population. Les critères utilisés pour la définir sont habituellement géographiques et fixés de manière empirique en fonction de la distance à la source. Ainsi, dans ce contexte, il est possible de se fonder sur la modélisation de la zone de dispersion de l'aérosol grâce aux travaux réalisés par le département R&D. La modélisation de la dispersion du panache permet de renseigner les zones de contamination possible en légionelles et de déterminer au mieux les points de mesures dans l'air et au-delà, d'affiner l'évaluation du risque en fonction des zones de dispersion.

Mais pour déterminer les expositions des populations et les emplacements des points de prélèvement, il ne faut pas oublier que les données démographiques peuvent évoluer, de même que les conditions météorologiques. Il faut donc tenir compte de la répartition de la population afin de repérer les zones de plus fortes densités et/ou des zones sous le vent, de moindre dispersion du panache. L'idéal est de trouver un optimum pour prendre en compte les deux aspects sachant que les deux sont susceptibles de varier.

5.3. Recommandations pour la localisation des points de prélèvement d'air

Il est difficile d'avoir une estimation de la concentration en légionelles issues des centrales à distance de celles-ci. Leur interprétation serait d'autant plus difficile que les données sur la relation dose-effet et la pathogénicité des espèces de légionelles sont incomplètes et peu nombreuses. Il existe d'autres sources naturelles dans l'environnement qui rendent difficile l'interprétation des mesures à distance des centrales pour ce qui est de l'origine de la source de bactéries.

En effet, à l'extérieur, de très nombreuses activités sont productrices d'aérosols biologiques. Les ambiances professionnelles sont classiquement décrites comme les plus contaminées, les secteurs les plus couramment cités étant l'agriculture, l'exploitation du bois et les activités entraînant la manipulation de déchets ou les stations d'épuration.

La zone située sous le vent est toujours la plus riche en bactéries. Il semble cependant qu'au-delà de quelques centaines de mètres de distance, plus aucun effet lié à l'activité ne soit perceptible, c'est-à-dire en dessous du seuil de détection [19].

Considérant les distances d'influence estimées par la modélisation, on peut penser qu'il peut y avoir superposition de l'émission d'aérosols de légionelles par les aérorefrigérants des centrales avec des aérosols émis par d'autres types d'activités aux alentours. Dans le cadre d'une évaluation spécifique à un site, mais portant sur des agents largement répandus dans l'environnement, l'usage de mesures ne permet pas de déterminer la part de l'exposition relevant de la situation étudiée. Ceci est d'autant plus préjudiciable, étant donné que la dispersion des légionelles dans l'air dépend des conditions météorologiques et que les épidémies les plus importantes de légionelloses rapportées à l'émission de tours aérorefrigérantes pourraient présenter des cas distants de quelques centaines de mètres à plusieurs kilomètres du point d'émission. Mais les CNPE sont généralement situés en milieu rural où il y a donc peu de sources de légionelles supplémentaires.

Un autre problème sous-jacent dans le cas des prélèvements à distance est l'éventualité que les concentrations en légionelles soient trop faibles pour être détectées, en particulier avec un protocole d'échantillonnage de l'air incertain. Les techniques ne sont pas forcément adaptées à des ambiances faiblement chargées en bactéries.

Or, d'après Deloraine [18], les concentrations en bactéries totales cultivables retrouvées dans l'air ambiant extérieur dépasseraient rarement 200 UFC/m³. Cet auteur décrit un travail autrichien (1998) sur la connaissance du bruit de fond au niveau microbiologique en zones plutôt rurales (village rural, terres agricoles, ferme isolée, zone d'activité, zone montagneuse, habitations avec parc), les bactéries dominantes seraient des staphylocoques et les bactéries Gram-négatives ne représenteraient que 2 % de l'ensemble de ces bactéries mesurées, dont le genre prédominant serait *Enterobacter sp.* Mais on ne sait pas ce qu'il en est des *Legionella*, les méthodes d'analyse utilisées n'étant pas spécifiques à cette bactérie.

Ainsi, si on reprend les résultats obtenus par le CSTB sur le site de Noroxo, on peut penser que la quantité de légionelles rencontrées ne représenterait que 0.05 à 0.09 % de la flore bactérienne totale mesurée dans l'environnement. Bien entendu, on ne peut pas extrapoler à l'environnement général ce rapport observé pour Noroxo, où une source très importante de légionelles était présente avec la lagune. Mais, avec un bruit de fond estimé à 200 UFC/m³, on peut évaluer dans ce cas ce que cela représenterait en légionelles, soit très approximativement environ 0,2 UFC/m³ seulement. Cet argument supplémentaire montre à nouveau qu'il n'est peut-être pas réaliste pour le moment d'envisager des mesures dans l'environnement pour évaluer l'exposition des populations aux légionelles. De plus, si l'on considère qu'il faut retenir la fraction cultivable comme fraction dangereuse, alors il faudrait pouvoir mesurer des concentrations inférieures à 0,2 UFC/m³ avec la méthode par culture, ce qui semble délicat étant donné la limite de détection estimée à 0,25 UFC/m³ pour des échantillons environnementaux. Ceci est d'autant plus vrai que, selon le volume d'air prélevé, on a vu que l'échantillon correspondait à un faible pourcentage du panache qui se disperse dans l'atmosphère.

Finalement, au vu de ces problèmes de multiples sources de légionelles et des problèmes techniques liés aux limites de détection des méthodes d'analyse et aux faibles volumes prélevés non représentatifs de l'ambiance réelle, on peut suggérer de se limiter aux mesures à la source. Dans la poursuite de la démarche exploratoire d'évaluation du risque par la métrologie dans l'air, l'ensemble de cette réflexion amène à recommander des mesures dans l'air à la source (avec sérotypage) afin d'avoir le terme source et de pouvoir ensuite utiliser le résultat pour la modélisation de la dispersion autour de la centrale à partir de cette concentration dans l'air. Il est en effet difficilement envisageable de retrouver l'origine des bactéries mesurées dans l'environnement. En théorie, l'idéal serait un typage de toutes les légionelles détectées pour voir celles qui proviennent de la tour, mais cela impliquerait aussi un typage des différentes origines possibles (tours, lagunes aérées, etc...), ce qui n'est pas possible en pratique. Sinon, il est intéressant de

connaître la contamination en légionelles à laquelle est exposée la population, mais on ne peut incriminer la centrale quant à l'origine de ces légionelles.

En effet, l'avantage de la localisation à la source est de ne tenir compte que des légionelles provenant du panache et d'éviter la superposition d'autres sources à distance. D'autre part, les résultats permettent par la suite de caler la modélisation de la dispersion à partir du terme source dans l'air. On élimine ainsi l'incertitude sur le transfert des légionelles de l'eau vers l'air (à partir de la mesure à la source dans l'eau) en tenant compte directement de la concentration transférée. Cela semble donc plus fiable que de se baser sur des mesures dans l'eau. La mesure tient alors compte du stress des bactéries causé par l'aérosolisation. Il peut être intéressant de comparer ces résultats avec ceux de la mesure à distance pour observer la proportion de légionelles ayant survécu dans l'air. Mais on vient toujours au même problème de la question du stress suite au prélèvement qui pourrait fausser l'observation. Cependant, il faut garder à l'esprit que ces mesures en sortie de panache ne représentent pas des mesures en conditions réelles d'exposition, mais d'un flux sortant de la tour.

5.4. Interprétation de la validité des résultats et du rapport avec la réalité du risque

Dans le cadre de l'estimation de l'abondance d'un agent pathogène, il est habituel d'avoir recours à une campagne d'analyses, c'est le cas généralement pour évaluer le risque hydrique avec des mesures dans l'eau incriminée.

Le suivi de la concentration des légionelles dans l'eau est une méthode indirecte pour déterminer le risque de légionellose. Ici, le milieu atmosphérique intervient uniquement comme compartiment de transfert et de dissémination de micro-organismes qui n'y trouvent pas les conditions favorables à leur multiplication. Les légionelles ne sont pas adaptées pour être vectorisées dans l'air, à moins peut-être d'être protégées durant leur transport par les amibes ou les flagellés par exemple. Les résultats de mesures sont à discuter du point de vue de la viabilité car cet aspect est différent qu'il s'agisse de l'eau ou de l'air. La collecte et le mesurage de germes présents dans l'air doivent en conséquence répondre à une double contrainte en assurant un prélèvement représentatif et significatif du milieu échantillonné et garantir au maximum aux particules biologiques des conditions de collecte compatibles avec le maintien de leur activité biologique. Dans le cas contraire, les résultats n'ont pas de sens.

On a vu que les techniques de prélèvement et d'analyse confèrent aux résultats plusieurs niveaux d'incertitude entre le milieu atmosphérique et l'échantillon du fait du faible volume prélevé, de la sélection des bactéries par l'appareil de prélèvement et du problème de survie des légionelles lors de l'échantillonnage. Mais, l'analyse conditionne aussi le type de résultats et la sensibilité donc l'état et la quantité de bactéries détectées. Il n'est pas certain que les résultats apportent quelque chose de plus au niveau sanitaire en matière d'exposition. Avant de discuter les résultats des mesures réalisées dans les panaches, il faut également garder à l'esprit les limites et la signification du résultat de chaque méthode de mesure. Du fait de la variation dans les opérations d'échantillonnage et d'analyse, le comptage des microorganismes dans l'air est, par conséquent, plutôt sous-estimé. On notera que, si les causes de variations sont bien listées qualitativement, l'ampleur de ces variations n'est souvent pas précisée.

Ainsi, une question majeure demeure l'issue de ces résultats. Il est probable que l'on puisse en tirer des éléments intéressants pour la caractérisation des expositions mais les résultats seront à interpréter avec prudence. Pour cela, des incertitudes demeurent en effet sur la nature des résultats à considérer en priorité du fait des lacunes sur la pathogénicité des légionelles elles-mêmes. Suivant la méthode d'analyse choisie, les résultats n'ont pas la même signification vis-à-vis de la réalité du risque sanitaire. L'estimation de l'exposition dépend de l'expression du résultat en termes de bactéries cultivables, viables, totales... On ne sait pas quel résultat doit être pris en compte pour

évaluer l'exposition, ni s'il faut considérer les BVNC. Les caractères cultivable et pathogène ne sont pas équivalents. Cela semble logique mais reste une hypothèse. Le résultat donné par la mise en culture apparaît plus significatif par rapport au risque. Si on retrouve des légionelles cultivables, on peut effectivement se poser des questions, mais on est susceptible de sous-estimer le risque du fait de l'existence de bactéries viables non cultivables.

Si on retrouve des légionelles non cultivables, on ne peut pas affirmer pour autant qu'il n'y a pas de danger. Un critère de cultivabilité ne suffit pas forcément. Les microorganismes non cultivables conduisent à une sous-estimation des cellules viables et potentiellement pathogènes. On ne sait rien scientifiquement à ce propos pour le moment, il est donc trop risqué de se baser sur un résultat exprimé en bactéries cultivables. Les non cultivables ne sont pas forcément sans risque. En effet, sur la base des résultats des études publiées à ce jour et par principe de précaution, il faut considérer que même des *Legionella* qui ont perdu, en passant dans la phase liquide (par opposition au support du biofilm), la faculté de cultiver peuvent être source de contamination. En effet, il est démontré qu'elles peuvent récupérer, en passant dans les amibes par exemple, leur capacité à être cultivées [54]. Ainsi, on pourrait imaginer qu'il en soit de même dans l'air et que les légionelles aient la capacité de récupération de leur activité métabolique et de leur faculté à cultiver dans les aérosols grâce à la présence d'amibes, voire aussi dans les cellules des organismes où elles pénètrent. Par conséquent, on ne peut se contenter d'une seule technique, il est impératif d'utiliser en parallèle plusieurs techniques de détection des légionelles.

Dans le doute, il est préférable d'avoir un critère de viabilité dans les résultats en raison du principe de précaution. Dès lors qu'une bactérie est viable, elle est susceptible d'être pathogène. Il n'y a que pour les bactéries mortes qu'on est assuré de l'absence de risque. Or, en considérant toutes les bactéries viables, on surestime le risque car elles ne sont pas forcément pathogènes. Et est-ce que cultivabilité implique pathogénicité ? Il semble donc préférable actuellement d'essayer de se baser sur les résultats donnés par la méthode FISH par exemple. Si la paroi membranaire de la cellule bactérienne est intacte alors elle est détectée et on peut logiquement penser que la bactérie est viable, mais rien n'est affirmé scientifiquement de manière certaine sur le critère de viabilité. On en vient ainsi à la question : qu'est-ce qu'une bactérie viable ? Une bactérie intègre au niveau membranaire, une bactérie cultivable ? En théorie, sans paramètre influant sur la cultivabilité de la bactérie, on devrait pouvoir retrouver une corrélation entre les résultats de la culture et de la FISH. Mais cette corrélation n'est plus vraie en raison des nombreuses sources de stress dans l'environnement. Une seule chose est sûre, si on a une réponse en culture, alors les autres techniques donneront forcément un signal. La relation entre la détection et la viabilité n'est, en outre, pas encore établie quelle que soit la méthode de mesure. Enfin, le critère de viabilité, s'il démontre que les espèces recherchées sont physiologiquement actives, la relation entre cet indicateur et la capacité pour un micro-organisme de se développer reste largement à démontrer.

Par ailleurs, les premiers résultats issus de la première phase de l'étude sur le site de Chinon apportent déjà quelques éléments intéressants. Tous les prélèvements pratiqués dans l'eau des bassins chauds et froids, ainsi que dans l'air se sont avérés positifs et ce, quelle que soit la méthode d'analyse utilisée (mise en culture, FISH, PCR). Les souches de *Legionella pneumophila* mesurées dans les aérosols ont été conservées et seront confiées au CNRL pour un typage. D'autres microorganismes ont également été identifiés dans les aérosols (protozoaires notamment), ce qui confirme qu'ils pourraient avoir un rôle dans la survie des légionelles comme le laisse supposer la littérature.

Cependant, ces premières bribes de résultats seront à confirmer dans le rapport d'étude officiel du CSTB pendant le mois de septembre 2004. Mais cette première approche confirme l'intérêt et la faisabilité des mesures dans les aérosols à la source et montre que les résultats ont un sens à plusieurs niveaux. Ces nouvelles mesures peuvent apporter un plus non négligeable, mais à manier avec précaution. Les mesures dans l'aérosol issu des panaches ne sont pas une fin en soi.

En marge du projet d'évaluation des risques, la campagne de mesures est soumise à un groupe d'experts. Cette démarche est difficile et novatrice, c'est pourquoi EDF a choisi de se référer à des experts internationaux (Allemagne, Etats-Unis, France, Grande-Bretagne, Suède). La composition a été choisie par la Direction du Parc Nucléaire (DPN). Il s'agit essentiellement de médecins, d'épidémiologistes, de chercheurs microbiologistes et notamment de spécialistes des légionelles. L'intérêt est d'avoir une vue différente du problème et de bénéficier de leur savoir et de leurs conseils sur les études légionelles qui sont menées à EDF. Ce comité a pour mission d'émettre en toute indépendance des avis de nature à éclairer la gestion du risque légionelles, afin d'établir des protocoles de mesure et d'en tirer des conclusions utiles pour l'exploitant.

Le SEM peut donc se baser sur leur avis au niveau de la validité des résultats des mesures dans l'air et de leur signification au niveau sanitaire, afin d'orienter la suite de l'approche par la métrologie de l'air. Mais, les membres de ce comité ne donnent pas forcément un panel suffisant des domaines d'expertise concernés par la problématique.

En effet, on peut constater qu'une seule personne vient du milieu industriel et connaît les contraintes réelles de terrain et les spécificités de ce domaine. Aucun de ces experts n'est un spécialiste du fonctionnement de tours aéroréfrigérantes, qui aurait été capable de renseigner sur le fonctionnement des tours et sur les possibilités de prélèvements. Il n'y a pas de spécialiste non plus de l'évaluation des risques sanitaires, ni des aérosols, ni de la modélisation, alors que ce sont des domaines qui interviennent de manière récurrente dans le cadre de l'évaluation du risque de légionellose comme l'a montré l'ensemble de ce rapport. Cette démarche est intéressante, mais ce n'est qu'un premier pas. Regrouper des experts internationaux issus de plusieurs domaines scientifiques est une bonne chose, mais dans ce cas les conclusions pourraient peut-être s'orienter plus du côté médical, épidémiologique et manquer d'un point de vue de gestionnaire de risque expérimenté. Le but n'est pas bien sûr d'arriver à une évaluation du risque *in fine*, mais uniquement à un avis sur les démarches adoptées et les résultats obtenus. Toutefois, le comité regroupe différents profils d'experts reconnus, mais il manque peut-être quelqu'un pour synthétiser cette réflexion pluridisciplinaire et permettre d'avancer concrètement en termes d'évaluation de risque sanitaire.

CONCLUSION

D'une manière générale, les études se référant à l'évaluation quantitative des risques sanitaires doivent respecter deux grands principes : le principe de cohérence et celui de transparence. La cohérence de la démarche impose l'usage des meilleures connaissances scientifiques du moment et le choix des méthodes les mieux adaptées et des hypothèses de calcul plausibles. La transparence consiste à présenter les critères ayant permis de les sélectionner. Les nombreuses lacunes dans les connaissances obligent à faire des choix et des hypothèses qui pèsent sur les estimations du risque, c'est pourquoi tout apport limitant le recours à ces choix présente *a priori* un intérêt. Il semble donc tout à fait justifié de vouloir mettre à profit les atouts de la métrologie dans les aérosols pour réaliser des évaluations de risque sanitaire liés aux légionelles issues des aéroréfrigérants industriels, notamment ceux des centrales nucléaires. Cependant, la métrologie peut générer des incertitudes qu'il convient de mettre en évidence et d'évaluer.

En théorie et en pratique, les techniques de prélèvement d'air ne sont pas parfaitement adaptées au germe particulier qu'est la légionelle et les méthodes d'analyse ne donnent pas forcément des résultats exploitables en matière de risque sanitaire. De plus les mesures de légionelles sur le lieu d'exposition des populations, c'est-à-dire loin de la source dans ce cas, sont confrontées à de nombreux obstacles techniques et à des difficultés d'interprétation.

La démarche par modélisation, qui permet d'estimer de faibles concentrations attribuables à l'installation (inaccessibles à la mesure), reste la solution permettant le mieux de satisfaire les besoins des gestionnaires de risque.

Des données d'entrée basées sur des mesures de légionelles dans l'air à la source permettraient d'éviter d'avoir recours à des hypothèses de transfert eau-air et apporteraient une information plus réaliste de l'exposition des populations aux légionelles aéropoortées. Même si à l'heure actuelle nous ne disposons pas d'assez d'éléments permettant d'inclure d'emblée ce type de données, l'avenir est prometteur. En effet une démarche exploratoire est en cours de réalisation sur le site de Chinon, qui couple mesure à la source et à distance; elle pourra sans doute orienter de nouvelles campagnes de mesure et constituer un apport dans notre connaissance de la survie des légionelles dans l'air et du taux de transfert de légionelles de l'eau vers l'air. Cette première phase pourrait enrichir les explorations épidémiologiques ultérieures et ainsi améliorer les connaissances sur les relations entre les résultats de mesure et le risque sanitaire. A terme, les évaluateurs de risque pourraient disposer de méthodologie de mesure dans l'air fiable, précise et sensible justifiant leur utilisation dans ce contexte.

Outre les problèmes métrologiques, d'autres aspects influent sur l'estimation de l'exposition et seraient à étudier en parallèle. Les incertitudes ne pèsent pas que sur les méthodes de prélèvement et d'analyse, mais se pose aussi un problème de représentativité des échantillons par rapport à la durée d'exposition pertinente à prendre en compte. Quelle période d'exposition cumulée aux légionelles est suffisante pour être contaminante et donc pertinente pour évaluer l'exposition d'un individu ? Il s'agit là d'un autre axe prometteur qui devrait fournir des pistes intéressantes pour l'évaluation de l'exposition.

Le pari de l'estimation de l'exposition aux légionelles par la métrologie dans l'air n'est pas encore gagné et celui de l'évaluation du risque de légionellose issu des tours aéroréfrigérantes industrielles non plus. Durant l'ensemble de ce travail, les contacts pris, les faits observés, les avis d'experts, ainsi que les visites sur le terrain ont constitué des sources fructueuses pour trouver matière à discuter sur la problématique et exploiter au mieux ces réflexions. Ils ont permis d'apporter des éléments de réponse et d'envisager des perspectives pour la suite, dans le but de faire avancer le vaste projet d'évaluation du risque légionelles. Souhaitons que les éléments rassemblés dans ce mémoire apportent ainsi quelque contribution à la problématique complexe que représente l'évaluation du risque sanitaire lié aux légionelles pour EDF...

Bibliographie

1. FRASER D., TSAI T., ORENSTEIN W. *et al.* Legionnaires'disease : description of an epidemic of pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 1977, vol. 297, n° 22, pp. 1189-1197
2. EDF-Gaz de France. Légionelloses : une gestion du risque en réseau, Guide de référence, 2001
3. BONNARD R. *Le risque biologique et la méthode d'évaluation du risque, Rapport final*, novembre 2001. Disponible sur Internet : <<http://www.ineris.fr>>
4. Résumé du Symposium *Legionella* de Lille, 06 septembre 2001. Disponible sur Internet : <<http://www.legionelle.com>>
5. INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE. Les légionelloses déclarées en France en 2002. *BEH*, 2003, n° 32, pp. 153-155
6. BALTU I., BAYEUX M.C. *Le point des connaissances sur les légionelles en milieu de travail*, ED 5012, 2001, 4p. Disponible sur Internet : <<http://www.inrs.fr>>
7. INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE. Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose, *BEH*, 1997, n° 20-22, pp. 83-97
8. PECHARMAN F. *Gestion du risque lié aux légionelles : stratégie de contrôle et de surveillance, étude technico-économique des procédés de lutte*. Mémoire de l'Ecole Nationale de Santé Publique, Rennes, 2002, 61 p.
9. CABANES P.A., Evaluation et gestion du risque légionellose. *Pollution Atmosphérique*, 2000, n° 168
10. SQUINAZI F. *Légionelles : les actions à mener*, Séminaire du Groupe Moniteur, Paris, 24 janvier 2002
11. CONSEIL SUPERIEUR D'HYGIENE PUBLIQUE DE FRANCE, Section des Eaux, Section des Milieux de Vie, Section des Maladies Transmissibles, *Gestion du risque lié aux légionelles*, 2001. Disponible sur Internet : <<http://www.sante.gouv.fr>>
12. MINISTERES CHARGES DE L'EMPLOI, DE L'ECONOMIE ET DE L'ENVIRONNEMENT. *Guide des bonnes pratiques - Legionella et tours aérorefrigérantes*. 2001. Disponible sur Internet : <<http://www.sante.gouv.fr>>
13. HEUZE G. *Evaluation du risque de légionellose lié à l'exposition au panache des centrales électriques : Réflexion sur le choix méthodologique d'une approche épidémiologique*. Mémoire de l'Ecole Nationale de la Santé Publique, Rennes, 2000, 60 p.
14. DROGUET J. *Danger représenté par les légionelles dans les aérosols issus des centrales électriques : incertitudes et besoins de connaissances*. Mémoire de l'Ecole Nationale de la Santé Publique, Rennes, 2000, 49 p.

15. MINISTERE DE L'EMPLOI ET DE LA SOLIDARITE. *Circulaire DGS n° DGS/VS4/98/771 du 31 Décembre 1998 relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements recevant du public*. Hygiènes, 1999, vol. 7, n° 3, pp 258-259.
16. MINISTERE DE LA SANTE, DE LA FAMILLE ET DES PERSONNES HANDICAPEES. *Circulaire DGS/SD7A-DHOS/E4-DPRS/SEI n° 2003/306 du 26 juin 2003 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les tours aérofrigorifères des établissements de santé*
17. FABRIES J.F. Particules dispersées dans l'air des lieux de travail : un risque pour la santé. *XXVIIèmes Journées Nationales de médecine du travail du BTP*, GNMBTP-AHI Santé en entreprise de Bordeaux, mai 2003
18. DELORAINE A. *Etude bibliographique sur l'évaluation des risques liés aux bioaérosols générés par le compostage des déchets – Synthèse des résultats*, CAREPS, contrat ADEME/CAREPS n°0075038, février 2002
19. AMBROISE D. *Influence de la variabilité de la mesure des bactéries de l'air sur l'évaluation du risque infectieux : exemple de la légionellose*. Thèse pour le doctorat de Biologie Santé Environnement : Université Henri Poincaré Nancy I, 2003. 201 p.
20. GRENIER D. Quantitative analysis of bacterial aerosols in two different dental clinic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, n° 8, pp. 3165-3168
21. EDUARD W., LACEY J., KARLSSON K. *et al.* Evaluation of methods for enumerating microorganisms in filter samples from highly contaminated occupational environments. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 1990, vol. 51, n° 8, pp. 427-436
22. LIGHTHART B., TONG Y. Measurements of total and culturable bacteria in the alfresco atmosphere using a wet-cyclone sampler. *Aerobiologia*, 1998, n° 14, pp. 325-332
23. LIN X., REPONEN T.A., WILLEKE K. *et al.* Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non evaporating liquid. *Atmospheric Environment*, 1999, vol. 33, pp 4291-4298
24. JUOZAITIS A., WILLEKE K., GRINSHPUN S.A. *et al.* Impaction onto a glass slide or agar versus impingement into a liquid for the collection and recovery of airborne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, vol. 60, n° 3, pp. 861-870
25. STAMPI S., ZANETTI F., CRESTANI A. *et al.* Occurrence and seasonal variation of airborne Gram-negative bacteria in a sewage treatment plant. *Microbiologica*, 2000, vol. 23, pp. 97-104
26. PALMER C.J., BONILLA G.F., ROLL B. *et al.* Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the Enviroamp *Legionella* PCR kit and direct fluorescent antibody staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, n° 2, pp. 407-412
27. ZINGESER J.A., BIRKHEAD G.S., MARMOLEN M. Air sampling for *Legionella*. *The Journal of the American Medical Association*, 1990, vol. 264, pp. 2625-2626

- 28.** BREIMAN R.F., COZEN W., FIELDS B. *et al.* Role of air sampling in investigation of an outbreak of legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser. *The Journal of Infectious Diseases*, 1990, vol. 161, pp.1257-1261
- 29.** OFFICE FEDERAL DE LA SANTE PUBLIQUE - DIVISION EPIDEMIOLOGIE ET MALADIES INFECTIEUSES (ed.), *Légionelles et légionellose - Particularités biologiques, épidémiologie, aspects cliniques, enquêtes environnementales, prévention et mesures de lutte*, Berne (Suisse), 1999. Disponible sur Internet : <<http://www.admin.ch/bag/infekt/index.htm>>
- 30.** ECOlogie Microbienne en Circuits d'eaux chaudes et en milieu Thermal (ECOMICTH), ECOMICTH Info, 2003, n°1
- 31.** MONTFORT P., BALEUX B. Bactéries viables non cultivables : réalité et conséquences. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie*, 1999, vol. 14, n° 3, pp. 201-207
- 32.** HEIDELBERG J.F., SHAHAMAT M., LEVIN M. *et al.* Effect of aerosolization on culturability and viability of Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, n° 9, pp. 3585-3588
- 33.** JEFFREY I., LANGE J.L., PETER S. *et al.* Application of flow cytometry and fluorescent in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, n° 4, pp. 1557-1563
- 34.** GAZENKO S.V., REPONEN T.A., GRINSHPUN S.A. *et al.* Analysis of airborne actinomycetes spores with fluorogenic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 64, n° 11, pp. 4410-4415
- 35.** CLOUD J.L., CARROLL K.C., PIXTON P. *et al.* Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, vol. 38, n° 5, pp.1709-1712
- 36.** AURELL H., CATALA P., FARGE P. *et al.* Rapid detection and enumeration of *Legionella pneumophila* in hot water systems by solid-phase cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, n° 3, pp. 1651-1657
- 37.** CNRL - HOPITAUX DE LYON, *Enquête épidémiologique à la suite d'un cas de légionellose*. Disponible sur Internet : <<http://dm3.univ-lyon1.fr/legio/LEGIONELLES7.htm>>
- 38.** GARRELLY L., MINERVINI C. Documentation technique sur la PCR quantitative appliquée à la recherche des *Legionella* dans les eaux, Bouisson-Bertrand Laboratoires, février 2004. Disponible sur Internet : <<http://www.buisson-bertrand.fr>>
- 39.** ALVAREZ A.J. *et al.* PCR for bioaerosol monitoring : sensitivity and environmental interference. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, n° 10, pp. 3639-3644
- 40.** NUGENT P.G., CORNETT J., STEWART I.W. *et al.* Personal monitoring of exposure to genetically modified microorganisms in bioaerosols : rapid and sensitive detection using PCR. *Journal of Aerosol Science*, 1997, vol. 28, n°3, pp. 525-538
- 41.** MEDEMA G., WULLINGS B., ROELEVELD P. *et al.* Risk assesment of *Legionella* and eneric pathogens in sewage treatment works. *America Water Works Association, International Symposium on Waterborne Pathogens*, Lisbonne, 22-25 septembre 2002

- 42.** MIYAMOTO H., YAMAMOTO H., ARIMA K. *et al.* Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of Legionellae in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, n° 7, pp. 2489-2494
- 43.** INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE. *Guide pour l'analyse du volet sanitaire des études d'impact*, 2000. Disponible sur Internet : <<http://www.invs.fr>>
- 44.** HAMBLETON P., BROSTER M.G., DENNIS P.J. *et al.* Survival of virulent *Legionella pneumophila* in aerosols, *Journal of Hygiene (Cambridge)*, 1983, vol. 90, pp. 451-460
- 45.** ISHIMATSU S., MIYAMOTO H., HORI H. *et al.* Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower. *The Annals of Occupational Hygiene*, 2001, vol. 45, n° 6, pp. 421-427
- 46.** THOS A.L. *Eléments de modélisation de l'exposition aux légionelles dans les établissements de santé et dans les établissements thermaux*. Mémoire de l'École Nationale de la Santé Publique, Rennes, 2003, 56 p.
- 47.** DENNIS P.J., LEE J.V. Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Journal of Applied Bacteriology*, 1988, vol. 65, n° 2, pp. 135-141
- 48.** STETZENBACH L.D. Airborne microorganisms. *Encyclopedia of Microbiology*. Academy Press, Inc. 1992, vol.1, pp. 53-65.
- 49.** KATZ S.M., HAMMEL J.M. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Annals of Clinical And Laboratory Science*, 1987, vol.17, n°3, pp. 150-156
- 50.** BHOPAL R.S., FALLON R.J., BUIST E.C. *et al.* Proximity of the home to a cooling tower and risk of non-outbreak legionnaires'disease. *British Medical Journal*, 1991, vol. 302, pp. 378-383
- 51.** BERENDT R.F., Survival of *Legionella pneumophila* in aerosols : Effect of relative humidity. *The Journal of Infectious Diseases*, 1980, vol. 141, n° 5, p. 689
- 52.** HA T.L., DELOGE M., MATHIEU L. *et al.* Design of an experimental chamber to study aerosols of *Legionella*, *19th Annual Meeting of the EWGLI*. 15-18 May 2004. Chamonix (France)
- 53.** DELOGE M., HA T.L., ROBINE E. *et al.* Aerosols containing *Legionella* measured by fluorescent *in situ* hybridisation : new approaches to metrology, *19th Annual Meeting of the EWGLI*. 15-18 May 2004. Chamonix (France)
- 54.** OHNO A., KATO N., YAMADA K. *et al.* Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, vol. 69, pp. 2540-2547

Liste des annexes

Annexe 1 : Schéma de principe du fonctionnement d'un CNPE

Annexe 2 : Différence de typologie entre les aéroréfrigérants des CNPE de Chinon et Civaux, et photographie aérienne d'un aéroréfrigérant de Chinon

Annexe 3 : Exemple de carte de modélisation de la dispersion du panache issu d'un aéroréfrigérant du CNPE de Chinon

Annexe 4 : Schéma de principe et photographie du préleveur cyclonique du CSTB

Annexe 5 : Résultats de mesure de la première phase d'investigations du CSTB sur le site de Noroxo

Annexe 6 : Vue d'un aéroréfrigérant du CNPE de Chinon et localisation de l'échaffaudage permettant d'accéder à différents niveaux de deux diffuseurs

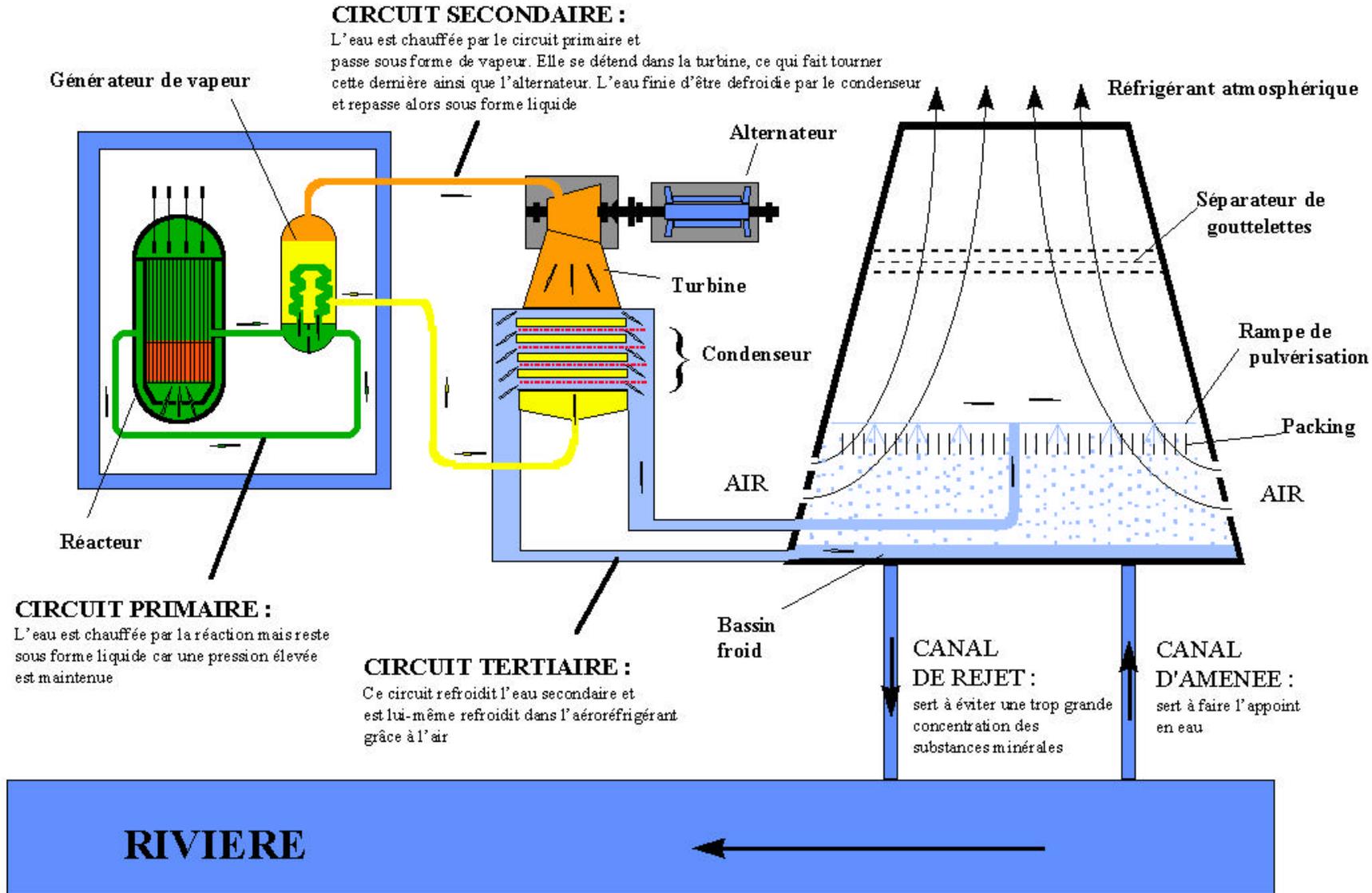
Annexe 7 : Photographies de l'intérieur d'une tour et localisation du prélèvement dans le réfrigérant

Annexe 8 : Principales caractéristiques techniques des circuits de la plateforme d'essais « SPECTRE » (Système Pilote d'Étude des Circuits Tertiaires de Refroidissement des Eaux)

Annexe 9 : Présentation des modules du moyen d'essais « PEEP » (Pilote d'Essai d'Entartrage de Packings)

Annexe 10 : Préleveur disposé sur une passerelle à l'intérieur de l'ilôt et vue de l'intérieur de l'aéroréfrigérant avec l'ilôt central au milieu des motoventilateurs

Annexe 11 : Vues de dessous d'un motoventilateur avec les passerelles d'accès



ANNEXE 2

Différence de typologie entre les aéroréfrigérants des CNPE de Chinon et Civaux



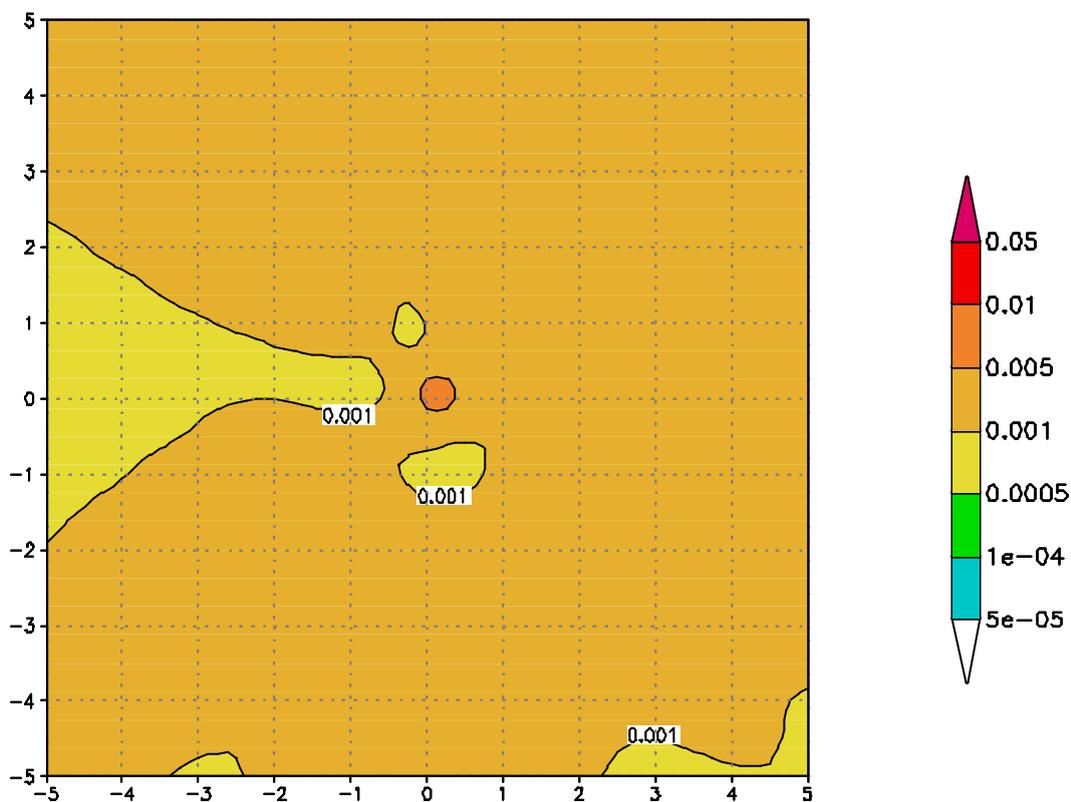
Photographie aérienne d'un aéroréfrigérant de Chinon



ANNEXE 3

Exemple de carte de modélisation de la dispersion du panache issu d'un aéroréfrigérant du CNPE de Chinon

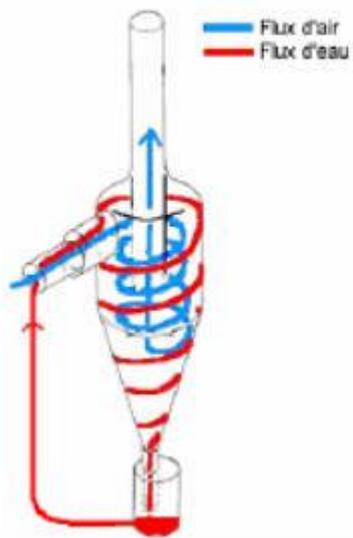
Concentration moyenne (UFC/m³)



(Graduation en km pour une taille des mailles de calcul égale à 125 m)

ANNEXE 4

Schéma de principe et photographie du préleveur cyclonique du CSTB



ANNEXE 5

Résultats de mesure de la première phase d'investigations du CSTB sur le site de Noroxo

Prélèvement NOROXO		Amont lagune	Lagune	270 m lagune
Identification du lieu		à 60 m environ du bassin de lagunage aérobie, en amont par rapport au vent	au bord du bassin de lagunage aérobie, en aval par rapport au vent	à 270 m environ du bassin de lagunage aérobie, en aval par rapport au vent
Volume air prélevé (m ³)		24 480	36 720	24 480
Conditions météo		soleil, vent 12 km/h, ouest/sud-ouest (261 °C) T=7,9 °C, humidité relative=98,7 %	soleil, vent 11 km/h, ouest/sud-ouest (261 °C) T=7 °C, humidité relative=79 %	nuageux, vent de 8 à 20 km/h, ouest (238 °C) T=7,5 °C, humidité relative=99 %
Flore bactérienne totale	B / m ³	1,1.10 ⁵	1,1.10 ⁶	1,9.10 ⁵
	UFC / m ³	3,3.10 ¹	4,8.10 ³	5,2.10 ¹
Légionelles	détection	+	+	+
	L / m ³	<LQ	2,9.10 ³	<LQ
	UFC / m ³	<LQ	5,4.10 ³	3,3.10 ²

<LQ : résultat inférieur à la Limite de Quantification

B / m³ : bactéries totales par m³ d'air (épifluorescence)

L / m³ : *Legionella sp.* par m³ d'air (FISH)

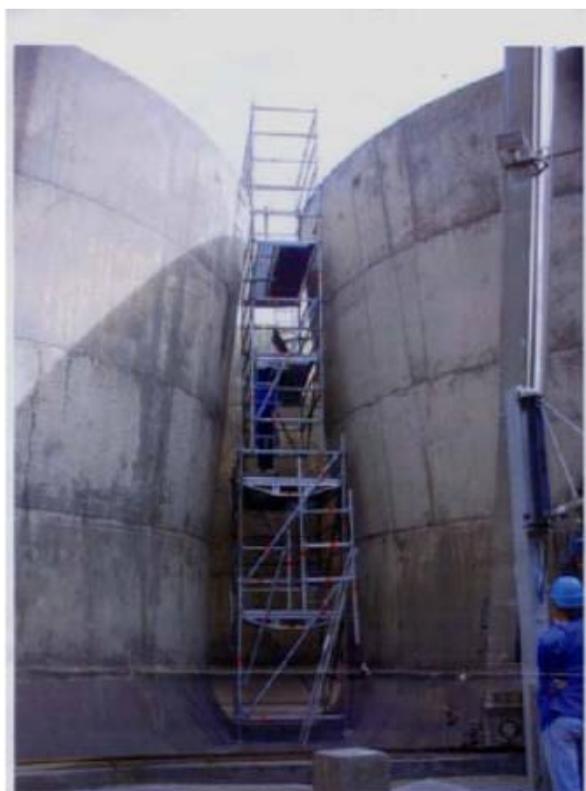
UFC / m³ : bactéries cultivables par m³ d'air (culture)

ANNEXE 6

Vue d'un aéroréfrigérant du CNPE de Chinon



Localisation de l'échafaudage permettant d'accéder   différents niveaux de deux diffuseurs



ANNEXE 7

Photographie de l'intérieur d'une tour



Localisation du prélèvement dans le réfrigérant



ANNEXE 8

Principales caractéristiques techniques des circuits de la plateforme d'essais « SPECTRE » (Système Pilote d'Etude des Circuits Tertiaires de Refroidissement des Eaux)

Les boucles d'essais comprennent les principaux éléments suivants :

- un bassin froid d'un volume maximum de 500 L (modulable)
- un condenseur tubulaire en inox de 316 L (longueur : 14m)
- un séjour chaud de volume maximum de 80 L (modulable)
- une tour aéroréfrigérante (débit d'air : 600 à 1000 Nm³/h)
- un circuit d'appoint (débit : 0 – 100 L/h)
- un circuit de purge (débit : 0 – 100 L/h).

Les caractéristiques de fonctionnement sont les suivantes :

- Débit de circulation 800 L/h à 1600 L/h (nominal)
- Température en entrée condenseur 20 – 35 °C
- Température sortie condenseur : 30 – 45 °C
- Vitesses de circulation dans le condenseur de l'ordre de 1,8 m/s
- Facteur de concentration 1,2 - 2
- Eau d'appoint = Eau d'appoint du site.



Aéroréfrigérant



**Bassin froid et condenseur
(en arrière plan)**

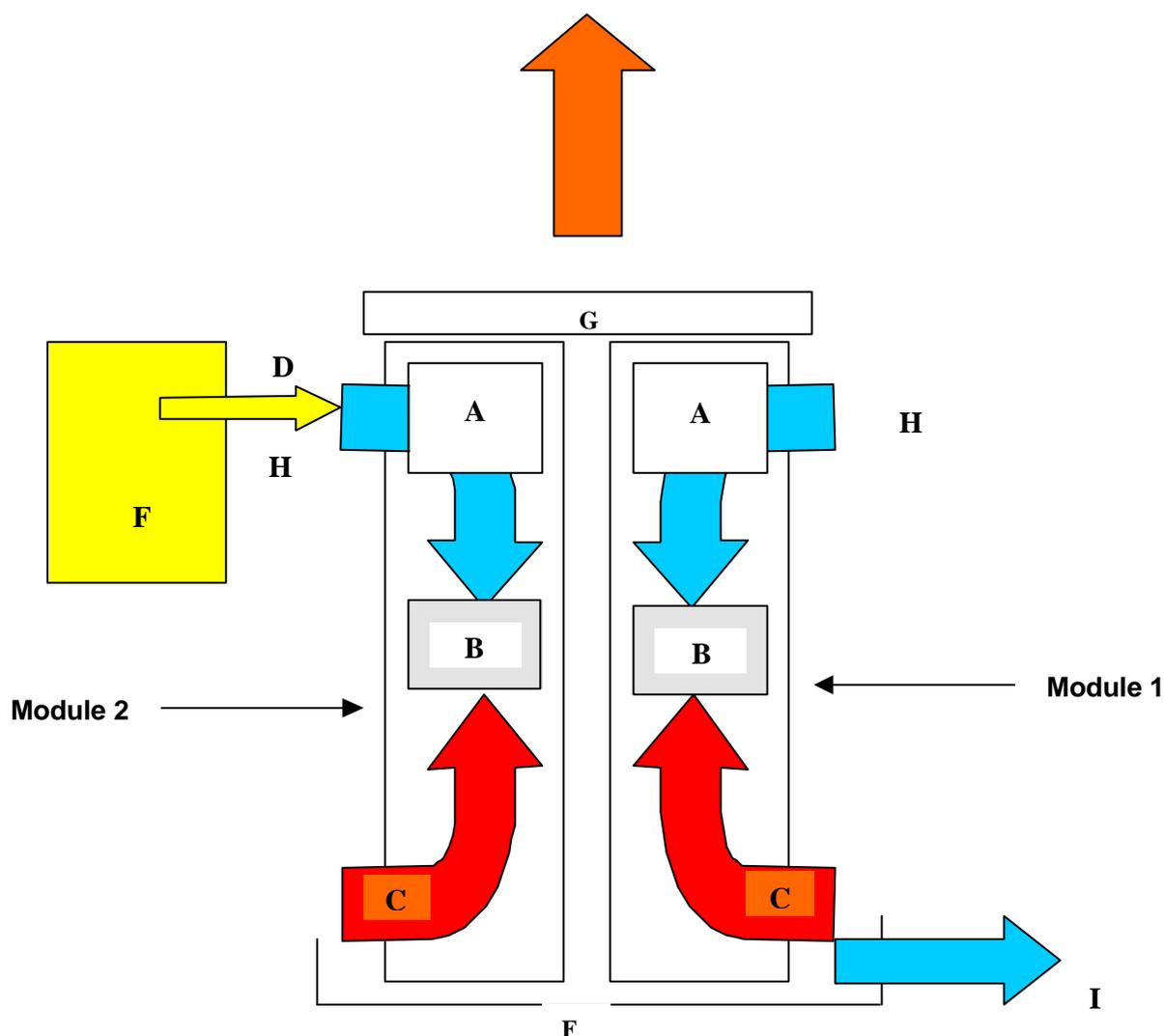
ANNEXE 9

Présentation des modules du moyen d'essais « PEEP » (Pilote d'Essai d'Entartrage de Packings)

Chaque module est constitué de :

- A. Un système d'aspersion sur le corps d'échange
- B. Un élément de packing sur lequel se produit l'aspersion
- C. Un système de ventilation ascendant
- D. Des pompes d'injection de réactifs (cuivre et zinc pour l'étude en cours)
- E. Une bûche contenant la solution de cuivre et de zinc à injecter pour l'un des modules
- F. Une bûche de récupération de l'effluent comportant une pompe de circulation (commun aux deux modules)
- G. Un système de pare-goutte et de traitement UV du panache émis par les modules d'échange thermique
- H. Une alimentation en eau des circuits de refroidissement pour chacun des modules 1 et 2
- I. Une pompe de ré-injection des effluents en sortie condenseur.

Schéma de principe du moyen d'essai PEEP



ANNEXE 10

Préleveur disposé sur une passerelle à l'intérieur de l'îlot



Vue de l'intérieur de l'aéroréfrigérant avec l'îlot central au milieu des motoventilateurs



ANNEXE 11

*Vues de dessous d'un motoventilateur
avec les passerelles d'accès*

