



Effets de deux procédés de traitement des tours aéro réfrigérantes vis-à-vis du développement des biofilms : cas particulier des légionnelles et des amibes

Zineddine Chaabna

► To cite this version:

Zineddine Chaabna. Effets de deux procédés de traitement des tours aéro réfrigérantes vis-à-vis du développement des biofilms : cas particulier des légionnelles et des amibes. Sciences agricoles. Université Grenoble Alpes, 2013. Français. <NNT : 2013GRENA002>. <tel-00825252>

HAL Id: tel-00825252

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00825252>

Submitted on 23 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biodiversité, Ecologie, Environnement

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Zineddine CHAABNA

Thèse dirigée par **Dominique FONTVIEILLE** et
codirigée par **Danièle ATLAN** et **Christophe GILBERT**
préparée au sein du **Centre Alpin de Recherche sur
les Réseaux Trophiques des Ecosystèmes Limniques**
dans l'École Doctorale **Science et Ingénierie des Systèmes, de
l'Environnement et des Organisations**

Effets de deux procédés de traitement des tours aéro-réfrigérantes vis-à-vis du développement des biofilms : cas particulier des légionelles et des amibes.

Thèse soutenue publiquement le « **26 février 2013** »,
devant le jury composé de :

Mme Christine ROQUES

Professeur, UMR 5503 – LGC, Université de Toulouse 3, Rapporteur

Mr Jean-Jacques GODON

Directeur de recherche, INRA de Montpellier, Rapporteur

Mr Alain RINCE

Professeur, IBFA, Université de Caen Basse Normandie, Président

Mme Sylvie GUITTONNEAU

Professeur, LCME, Université de Savoie, Membre

Mr Christophe GILBERT

Maitre de conférences, HDR, Université Claude BERNARD, Lyon 1,
Membre

Mr Dominique FONTVIEILLE

Professeur, Université de Savoie, Membre



Remerciements

Tout d'abord j'aimerais adresser mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, M. Dominique FONTVIEILLE, pour la confiance et l'autonomie qu'il m'accordées, mais aussi pour les conseils avisés et son encadrement, l'aide technique notamment via ses idées de créations ingénieuses qui étaient indispensables au bon déroulement du projet Légiosecure dans son ensemble. Je voudrais également le remercier pour ses aides sur le terrain, les conseils et les encouragements lors de la rédaction du manuscrit, sans oublier sa patience lors de mes multiples sollicitations.

Je remercie particulièrement, ma codirectrice de thèse, Mme Danièle ATLAN de m'avoir également donné sa confiance pour la réalisation de certains de mes travaux dans son laboratoire. Je la remercie également pour ses conseils précieux, pour son aide lors de la réalisation des manipulations. Sans oublier son aide lors de la rédaction de mon manuscrit. Je la remercie vivement pour la qualité de l'encadrement qui m'a été réservée dans son laboratoire.

Je remercie particulièrement, et vivement, mon codirecteur de thèse, M. Christophe GILBERT, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour les conseils qu'il m'a donnés lors de ma présence dans son laboratoire. Je le remercie particulièrement d'avoir accepté de continuer mon encadrement à la place de Danièle. Je le remercie vivement pour son aide, plus que précieuse, lors de la rédaction du manuscrit.

Je remercie l'ensemble de mes directeurs de thèse pour tous ce qu'ils m'ont appris durant ces années de doctorat.

Je remercie également les responsables du pôle de compétitivité AXELERA et l'ensemble des partenaires (le FUI, le CG38, La Région Rhône Alpes) qui ont supporté le programme Légiosecure.

Je remercie vivement Mme Christine ROQUES et M. Jean-Jacques GODON d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également M. Alain RINCE de me faire l'honneur de participer à mon jury.

Je remercie également M. Charles DUBOST, directeur de la société Thétis Environnement, d'avoir accepté de participer au jury (invité) mais surtout de l'enthousiasme et de l'engagement qu'il a démontré pour la réussite du projet ainsi que pour les moyens techniques qu'il a mis à la disposition du laboratoire pour la réalisation des travaux de recherche.

Je remercie également Mme Sylvie GUITTONNEAU pour sa participation au jury et pour les conseils précieux et l'aide technique qu'elle m'a apporté tout au long de ma thèse et de m'avoir permis l'accès à son laboratoire quand cela a été nécessaire.

Je remercie également M. Philippe ZYDOWICZ de la société ARKEMA, de l'aide technique qu'il a apporté pour la réalisation des travaux de recherche mais également de l'engagement qu'il a démontré pour le projet Légiosecure.

Mes remerciements vont évidemment à Mlle Sylvie VIBOUD pour son aide et ses conseils précieux et pour l'implication qu'elle a témoignée pour ce projet tout au long de ma thèse. Je la remercie tout simplement pour tous ce qu'elle m'a appris.

Je remercie également Mme Sophie JARRAUD, Mme Monique REYROLLE et Mme Françoise FOREY de m'avoir permis d'accomplir certains travaux au CNRL et de leur implication pour la rédaction de la publication.

Je remercie tout particulièrement Mlle Tamara PUTOIS avec laquelle une partie des travaux a été réalisée en binôme. Je la remercie de m'avoir formé dans le domaine de la chimie et de m'avoir supporté durant ces travaux.

Je remercie également le personnel du CARRTEL, en particulier Mme Annie MILLERY et Nathalie TISSOT pour l'aide qu'ils m'ont apporté pour la réalisation de certains travaux.

Je remercie tous le personnel du laboratoire Microbiologie, Adaptation et Pathogénie de l'université Lyon 1. Je tiens à remercier particulièrement Mme Claire ANDREA pour sa disponibilité et l'aide précieuse qu'elle m'a apporté.

Je remercie M. Bernard FANGET (Edytem, Université de Savoie) et Séverine ALLEGRA (GIMAP, Université Jean MONNET) pour l'aide qu'ils m'ont apporté pour certaines analyses.

Je remercie Mme Marie Eve GASTALDER et Marion SAINT OUEN de COFFELY, M. Sylvain ROUANET de Thétis Environnement, M. Xavier BAYLE de BIO UV, M. Sébastien QUETIER de la société ARKEMA, et M. Pascal DORIENZO du CG 38 pour l'aide technique qu'ils ont pu apporter pendant la réalisation de mes travaux de recherche. Je remercie particulièrement M. BIENVENUE (termes d'Aix Les Bains) pour sa disponibilité et l'accès qu'il nous a autorisé à la source « Soufre ».

Je remercie ma chère épouse de la patience qu'elle a témoignée durant ces années de thèse, de son encouragement qui n'a jamais cessé jusqu'à la fin. Je la remercie aussi de m'avoir permis d'être « papa », événement qui a rendu la vie plus joyeuse et le stress de la thèse beaucoup plus supportable. Je dédie ce travail aussi à mon petit chou pour qui je souhaite un avenir radieux (*pas forcément dans le secteur de la recherche !*)

Je tiens à dédier ce travail à mes parents auxquels je n'ai pas besoin de donner de raisons pour leur dire un GRAND MERCI.

Enfin je remercie toutes personnes que j'ai pu oublier de citer.

I.	CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE	14
II.	CHAPITRE II : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	17
II.1	TOURS AERO-REFRIGERANTES (TARS) A VOIE HUMIDE OUVERTE	17
II.1.1	Définitions.....	17
II.1.2	Principe de fonctionnement.....	17
II.1.3	Problèmes d'exploitation liés à la santé publique	18
II.1.4	Populations microbiennes des TARs	19
II.1.5	Surveillance microbiologique des TARs.....	20
II.1.6	Dispositions à prendre dans le cas d'apparition d'un cas de légionellose	21
II.2	LES BIOFILMS.....	22
II.2.1	Généralités :.....	22
II.2.2	Formation et maturation des biofilms	23
II.2.3	La phase d'accrochage.....	24
II.2.3.1	Phase réversible de l'accrochage	24
II.2.3.2	Phase irréversible d'accrochage et phase de croissance	25
II.2.3.3	Phase de maturité.....	28
II.2.1	Rôle de la matrice exopolymérique	29
II.2.2	Organismes constitutifs et diversité spécifique des biofilms	29
II.2.3	Mécanismes de résistances des biofilms au stress environnementaux et aux traitements de désinfection	31
II.2.3.1	Limitation de la diffusion des molécules antimicrobiennes.....	31
II.2.3.2	Coopération métabolique et interactions microbiennes	32
II.2.3.3	Réduction du taux de croissance	32
II.2.3.4	Bactéries dites persistantes « Persisters »	33
II.2.3.5	Quorum-sensing	34
II.2.3.6	Réponses adaptatives aux stress environnementaux.....	34
II.2.4	Spécificité des biofilms des TARs.....	36
II.2.4.1	Facteurs susceptibles d'induire une spécificité des biofilms des TARs	36
II.2.4.2	Composition des communautés microbiennes des TARs	37
II.2.4.3	Cas particulier de Legionella pneumophila	38
II.3	LEGIONELLA ET LEGIONELLOSE.....	39
II.3.1	Historique	39
II.3.2	Taxonomie	39
II.3.2.1	Morphologie de la bactérie.....	39
II.3.2.2	Caractères phénotypiques et biochimiques.....	40
II.3.2.3	Conditions et milieux de culture	40
II.3.2.4	Phylogénie du genre Legionella	41
II.3.2.5	Diversité et originalités des génomes de L. pneumophila séro groupe 1	42
II.3.3	Affections de l'homme liées aux légionelles	45
II.3.3.1	Différentes Formes de la maladie	45
II.3.3.1.1	La maladie du Légionnaire (légionellose)	45
II.3.3.1.2	La fièvre de Pontiac	46
II.3.3.1.3	Les légionelloses extra-pulmonaires.....	46
II.3.3.2	Prévalence et facteurs de risques	46
II.3.3.3	Les espèces et les sérogroupes associés à la légionellose	47
II.3.4	Virulence	48
II.3.4.1	Facteurs de virulence et structures de la surface bactérienne	50
II.3.4.2	Les systèmes de sécrétion de L. pneumophila et les facteurs de virulence 'transloqués' dans la cellule hôte	51
II.3.5	Ecologie des légionelles	54
II.3.5.1	L. pneumophila et l'état Viable mais non cultivable	54
II.3.5.2	Interaction de Legionella avec les amibes	55
II.3.5.3	Interaction de Legionella avec les biofilms	58
II.3.6	Méthode d'identification et de caractérisation des légionelles	59
II.3.6.1	Méthodes de diagnostic.....	59
II.3.6.1.1	Culture	59
II.3.6.1.2	Méthodes immunologiques.....	60
II.3.6.1.2.1	Test sérologique indirect et immunofluorescence	60
II.3.6.1.2.2	Détection des légionelles par immunofluorescence direct	60
II.3.6.1.2.3	Détection de l'antigène soluble urinaire	61
II.3.6.1.3	Méthodes moléculaires	61

II.3.6.2	Méthodes de typage	62
II.3.7	<i>Techniques d'échantillonnage des biofilms</i>	62
II.3.7.1	Cas général.....	62
II.3.7.2	Cas spécifique des TARs	64
II.3.8	<i>Techniques d'analyse des biofilms</i>	64
II.3.8.1	Analyses globales	65
II.3.8.1.1	Biomasse bactérienne totale	65
II.3.8.1.2	Activité métabolique globale du biofilms	65
II.3.8.1.3	Techniques en développement	66
II.3.8.2	Analyse spécifiques.....	66
II.3.8.2.1	<i>L. pneumophila</i>	66
II.3.8.2.2	Protistes.....	67
II.4	SOLUTIONS ACTUELLES DE TRAITEMENTS DES BIOFILMS APPLIQUEES AUX TAR S	67
II.4.1	<i>Traitements physiques</i>	68
II.4.1.1	Traitement thermique	68
II.4.1.2	Les ultraviolets (UV)	69
II.4.1.3	Les ultrasons	70
II.4.2	<i>Traitements chimiques</i>	71
II.4.2.1	Les agents oxydants	71
II.4.2.1.1	Le chlore	71
II.4.2.1.2	La chloramine	73
II.4.2.1.3	L'ozone	74
II.4.2.1.4	Le Peroxyde d'hydrogène	74
II.4.2.2	Biocides non oxydants	75
II.4.3	<i>Effet des biocides vis-à-vis des amibes associées à L. pneumophila</i>	76
II.4.4	<i>Reviviscence bactérienne</i>	77
II.5	OBJECTIFS.....	79
III.	CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES.....	81
III.1	INTEGRATION DE L'ANALYSE DES BIOFILMS DANS L'ETUDE DES EFFETS DES BIOCIDES SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES. 81	
III.2	ETUDES DES EFFETS DES TRAITEMENTS BIOCIDES VIS-A-VIS DES COMMUNAUTES MICROBIENNES PLANCTONIQUES ET FIXEES DANS DES CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	81
III.2.1	<i>Choix du modèle et origine des biofilms</i>	81
III.2.2	<i>Démarche expérimentale</i>	82
III.2.2.1	Développement des biofilms	82
III.2.2.2	Pilote expérimental.....	83
III.2.2.2.1	Les réacteurs biologiques	83
III.2.2.2.2	Les réservoirs d'eau	84
III.2.3	<i>Particularité des traitements PEROX</i>	84
III.2.3.1	Le réacteur UV (Bio-UV).....	84
III.2.3.2	Schéma récapitulatif de l'installation expérimentale des essais PEROX	84
III.2.3.3	Adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire	86
III.2.3.3.1	Composition chimique de l'eau de recirculation	86
III.2.3.3.2	Etude de l'adaptation des biofilms après leur transfert dans les conditions de laboratoire	86
III.2.3.4	Etude de l'efficacité du procédé PEROX vis-à-vis des biofilms.....	87
III.2.3.4.1	Injection et contrôle des concentrations d'H ₂ O ₂	87
III.2.3.4.2	Les variantes étudiées du procédé PEROX.....	87
III.2.3.4.2.1	Peroxyde d'hydrogène	87
III.2.3.4.2.2	Irradiations UV (UVC)	88
III.2.3.4.2.3	Couplage H ₂ O ₂ /UV.....	88
III.2.4	<i>Particularité des traitements SECUROX</i>	88
III.2.4.1	Démarche expérimentale	88
III.2.4.2	Dispositif expérimental.....	89
III.2.4.3	Adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire	90
III.2.4.4	Modalité d'injection et concentration testés du ClO ₂	91
III.2.4.4.1	Modalités d'injection du ClO ₂	91
III.2.4.4.2	Suivi des concentrations du ClO ₂	91
III.2.4.5	Bilan des essais effectués.....	91
III.3	ETUDES DES EFFETS DES TRAITEMENTS BIOCIDES VIS-A-VIS DES COMMUNAUTES MICROBIENNES FIXEES ET PLANCTONIQUES DANS LES CONDITIONS DE TOURS AERO-REFRIGERANTES EN VRAIE GRANDEUR.....	92
III.3.1	<i>Démarche expérimentale</i>	92
III.3.2	<i>Sites d'échantillonnage</i>	92

III.3.1	<i>Campagnes de mesure et traitements appliqués</i>	93
III.3.1.1	Campagne 2009	93
III.3.1.2	Campagne 2010	93
III.3.1.3	Campagne 2011	94
III.3.2	<i>Traitements biocides sur les sites</i>	94
III.3.2.1	Traitement de référence.....	94
III.3.2.2	Traitement au ClO ₂ (Securox)	95
III.3.2.3	Traitement au couple H ₂ O ₂ /UV.....	95
III.3.3	<i>Modes d'échantillonnages</i>	96
III.3.3.1	Substrats en place.....	96
III.3.3.2	Substrats artificiels.....	96
III.4	ETUDES DES EFFETS DES TRAITEMENTS PEROX VIS-A-VIS DE LA MATIERE ORGANIQUES (EN ABSENCE DE BIOFILM)	98
III.4.1	<i>Mesure du carbone Organique Assimilable (AOC)</i>	98
III.4.2	<i>Mesure du carbone organique dissous biodégradable (CODB)</i>	98
III.4.3	<i>Préparation de la verrerie</i>	99
III.4.4	<i>Essais 1</i>	100
III.4.4.1	Préparation des solutions d'acides humiques, de tryptone et du mélange acides humiques/tryptone	100
III.4.4.2	Procédure de traitement	101
III.4.5	<i>Essai 2</i>	102
III.4.5.1	Préparation des solutions d'acides humiques	102
III.4.5.2	Procédure de traitement	102
III.4.6	<i>Essai 3</i>	103
III.4.6.1	Préparation des solutions d'acides humiques/tryptone.....	103
III.4.6.2	Procédure de traitement	104
III.4.7	<i>Traitements appliqués aux solutions de matières organiques</i>	105
III.4.7.1	Traitement à l' H ₂ O ₂	105
III.4.7.2	Traitement par le couple H ₂ O ₂ /UV.....	105
III.4.7.3	Traitements aux UV	106
III.4.7.4	Préparation de la suspension bactérienne.....	106
III.4.7.5	Dosage du carbone total, dissous et calcul du CODB.....	106
III.4.8	<i>Caractérisation moléculaire des solutions de matière organique par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC)</i>	107
III.4.9	<i>Mesure de la toxicité des solutions de matières organiques traitées</i>	108
III.5	CARACTERISATION DES LEGIONELLES ISOLEE DE LA SOURCE THERMALE 'SOUFRE'	108
III.5.1	<i>Isolement des souches de Legionella environnementales</i>	108
III.5.2	<i>Isolats cliniques et souches de référence</i>	108
III.5.3	<i>Caractérisation phénotypique des isolats</i>	109
III.5.3.1	Criblage macroscopique.....	109
III.5.3.2	Criblage par culture sur BCYE sans L-cystéine.....	109
III.5.3.3	Criblage par la température d'incubation.....	109
III.5.3.4	Criblage par le test catalase	109
III.5.4	<i>Caractérisation moléculaire des isolats</i>	110
III.5.4.1	Préparation d'un lysat bactérien	110
III.5.4.2	Amplification de gènes par PCR.....	110
III.5.4.3	Séquençage : Contrôle et purification des amplicons pour le séquençage	110
III.5.4.4	Analyse de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (PFGE)	111
III.5.5	<i>Caractérisation immunologique</i>	111
III.5.5.1	Caractérisation immunologique par le kit Legionella Latex Test (Oxoid, DR0800M).....	111
III.5.5.2	Caractérisation immunologique par le kit SLIDEX® Legionella Kit - référence 73120 (bioMérieux)	111
III.5.6	<i>Estimation du pouvoir de virulence des légionelles vis à vis de l'amibe A. castellanii</i>	112
III.5.6.1	« Amoeba Plate test ».....	112
III.5.6.1.1	Préparation d'une culture d' <i>A. castellanii</i>	112
III.5.6.1.2	Préparation des cultures de légionelles.....	113
III.5.6.2	Test de virulence des légionelles en milieu liquide.....	113
III.5.6.2.1	Préparation de la suspension amibienne.....	113
III.5.6.2.2	Préparation des suspensions de légionelles	113
III.5.6.2.3	Infection d' <i>Acanthamoeba</i> par les légionelles en milieu liquide	113
III.5.6.2.4	Quantification des légionelles extracellulaires après l'infection	114
III.5.6.2.5	Cytotoxicité de <i>Legionella</i>	114
III.5.7	<i>Traitements biocides</i>	114
III.5.7.1	Souches bactériennes	114
III.5.7.2	Traitements biocides	115

III.5.7.2.1	Traitement à l'H ₂ O ₂	115
III.5.7.2.2	Traitement aux UV.....	115
III.5.7.2.3	Traitement H ₂ O ₂ /UV.....	115
III.5.7.2.3.1	Cinétique de dégradation de l'H ₂ O ₂	115
III.5.7.2.3.2	Traitement des suspensions bactériennes.....	116
III.5.7.3	Mesure de l'effet des traitements biocides.....	116
III.5.8	<i>Effet des traitements sur le pouvoir pathogène des légionelles</i>	116
III.5.9	<i>Détection des mutations après les traitements UV et H₂O₂/UV</i>	116
III.6	ANALYSE MICROBIOLOGIQUES.....	117
III.6.1	<i>Récupération des lames de verre et préparation des suspensions de biofilms</i>	117
III.6.2	<i>Dénombrement des bactéries totales</i>	117
III.6.3	<i>Dénombrement des bactéries totales cultivables</i>	118
III.6.4	<i>Mesure de la concentration en ATP</i>	118
III.6.5	<i>Dénombrement des bactéries de l'espèce L. pneumophila ("Lp totales") par immunofluorescence</i>	118
III.6.6	<i>Dénombrement des formes cultivables de L. pneumophila</i>	119
III.6.6.1	Par culture sur milieu solide spécifique.....	119
III.6.6.2	Par séparation immuno magnétique (IMS).....	119
III.6.7	<i>Dénombrement des amibes</i>	120
III.6.8	<i>Récapitulatif des indicateurs analysés et des techniques utilisées</i>	120
IV.	CHAPITRE IV : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LEGIONELLES A PARTIR D'UNE SOURCE ENVIRONNEMENTALE, CAS PARTICULIERS DE LA SOURCE « SOUFRE » D'AIX LES BAINS	123
IV.1	CONTEXTE DE L'ETUDE.....	123
IV.2	RESULTATS.....	124
IV.2.1	<i>Isolement de souches de Legionella et criblage phénotypique</i>	124
IV.2.1.1	Observation des colonies sous la loupe binoculaire.....	124
IV.2.1.2	Test de l'activité catalase.....	124
IV.2.1.3	Auxotrophie pour la cystéine.....	125
IV.2.1.4	Températures optimales de croissance.....	125
IV.2.2	<i>Criblage immunologique</i>	125
IV.2.3	<i>Criblage moléculaire</i>	127
IV.2.3.1	PCR: polymerase chain reaction.....	127
IV.2.4	<i>Bilan des typages moléculaire et immunologique</i>	130
IV.2.5	<i>Etude de la diversité moléculaire des légionelles isolées de la source « Soufre » d'Aix Les Bains</i>	132
IV.2.5.1	PFGE : Comparaison des pulsotypes des isolats environnementaux.....	132
IV.2.5.2	Les séquences mip.....	133
IV.2.5.3	Relations entre pulsotypes, sérotypes et séquences mip.....	134
IV.2.6	<i>Comparaison des séquences du gène mip des isolats environnementaux de la source Soufre et celles des isolats cliniques référencés</i>	136
IV.2.7	<i>Bilan des différents criblages des isolats de légionelles de la source soufre</i>	137
IV.2.8	<i>Virulence</i>	138
IV.2.8.1	"Plate test".....	138
IV.2.8.2	Test d'infection liquide.....	140
IV.2.8.2.1	Estimation des légionelles extra cellulaires : virulence vis-à-vis d' <i>A. castellanii</i>	140
IV.2.8.2.2	Cytotoxicité.....	142
IV.2.9	<i>Coïnfection d'<i>A. castellanii</i> par deux souches : Lp1 et Lp12</i>	143
IV.2.10	<i>Effet des traitements biocides sur les concentrations des isolats environnementaux de L. pneumophila (étude in vitro)</i>	144
IV.2.10.1	Choix du milieu de culture.....	144
IV.2.10.2	Cinétique de dégradation de l'H ₂ O ₂	144
IV.2.10.3	Viabilité des L. pneumophila dans les variantes du milieu BYE.....	145
IV.2.10.4	Cinétique de dégradation de l'H ₂ O ₂ dans le BYE modifié.....	146
IV.2.10.4.1	Effet des UV et du couple H ₂ O ₂ /UV.....	146
IV.2.10.4.2	Effet des concentrations d' H ₂ O ₂	147
IV.2.10.5	Effet des traitements biocides H ₂ O ₂ /UV et UV sur la virulence des isolats environnementaux de L. pneumophila sg 1.....	149
IV.2.10.6	Détection de mutation après les traitements biocides H ₂ O ₂ /UV et UV.....	149
IV.3	DISCUSSION.....	152
V.	CHAPITRE V : MISE AU POINT DU PROCEDE PEROX POUR LE TRAITEMENT DU RISQUE LEGIONELLA DANS LES TOURS AEROREFRIGERANTES : ETUDE EXPERIMENTALE	157

V.1	CONTEXTE DE L'ÉTUDE	157
V.2	RESULTATS.....	158
V.2.1	<i>Effet des traitements PEROX sur les communautés microbiennes planctoniques et fixées (biofilms)</i> 158	
V.2.1.1	Adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire	158
V.2.1.1.1	Activité métabolique	158
V.2.1.1.2	Bactéries cultivables	159
V.2.1.1.3	Bactéries totales	160
V.2.1.2	Détermination de la durée de la phase de stabilisation	160
V.2.1.3	Cinétique de dégradation de l'H ₂ O ₂	161
V.2.1.4	Flux réels d'H ₂ O ₂ au cours des traitements PEROX (en présence de biofilms)	164
V.2.1.4.1	Flux d'H ₂ O ₂ au cours des traitements à l'H ₂ O ₂ seul	164
V.2.1.4.2	Flux d'H ₂ O ₂ au cours des traitements à l'H ₂ O ₂ couplé aux UV	165
V.2.1.5	Effet des traitements biocides sur les communautés microbiennes du biofilms.....	167
V.2.1.5.1	Traitements aux UV.....	167
V.2.1.5.1.1	Analyses non spécifiques	167
V.2.1.5.1.2	Analyses spécifiques.....	168
V.2.1.5.1.2.1	<i>Legionella pneumophila</i>	168
V.2.1.5.1.2.2	Amibes	169
V.2.1.5.2	Traitement au peroxyde d'hydrogène.....	170
V.2.1.5.2.1	Activité métabolique	170
V.2.1.5.2.2	Bactéries Cultivables	170
V.2.1.5.2.3	Bactéries totales.....	171
V.2.1.5.2.4	<i>Legionella pneumophila</i>	172
V.2.1.5.2.5	Amibes	173
V.2.1.5.3	Le traitement H ₂ O ₂ /UV.....	174
V.2.1.5.3.1	Activité métabolique	174
V.2.1.5.3.2	Bactéries cultivables.....	175
V.2.1.5.3.3	Bactéries totales.....	176
V.2.1.5.3.4	<i>Legionella pneumophila</i>	177
V.2.1.5.3.5	Amibes	179
V.2.1.6	Effet des traitements biocides H ₂ O ₂ , UV et H ₂ O ₂ /UV sur la charge microbiologiques de l'eau de recirculation 181	
V.2.1.6.1	Traitement UV	181
V.2.1.6.2	Traitement au peroxyde d'hydrogène.....	183
V.2.1.6.3	Traitement H ₂ O ₂ /UV.....	185
V.2.1.6.3.1	Activité métabolique	185
V.2.1.6.3.2	Bactéries cultivables.....	186
V.2.1.6.3.3	Bactéries totales.....	187
V.2.1.7	Comparaison de l'efficacité des procédés de traitements après standardisation des résultats.....	188
V.2.1.7.1	Effet de la concentration de l'H ₂ O ₂	190
V.2.1.7.1.1	Analyses non spécifiques	190
V.2.1.7.1.1.1	En absence de rayonnement UV.....	190
V.2.1.7.1.1.2	En présence de radiations UV	193
V.2.1.7.1.2	Analyses spécifiques.....	195
V.2.1.7.2	Observation de processus de reviviscence	196
V.2.1.8	Mise en évidence du phénomène d'adaptation à l'H ₂ O ₂	197
V.2.1.9	Effet des traitements H ₂ O ₂ seul, UV seul et du couplage H ₂ O ₂ /UV sur les concentrations des matières organiques dans l'eau de recirculation	200
V.2.1.9.1	Effet de l'H ₂ O ₂	200
V.2.1.9.2	Effet des UV.....	201
V.2.1.9.3	Effet du couple H ₂ O ₂ /UV	202
V.2.2	<i>Effet des traitements UV, H₂O₂ et du couple H₂O₂/UV sur les concentrations du carbone organique dissous et du carbone organique dissous biodégradable en l'absence de biofilms.</i>	204
V.2.2.1	Résultats de l'essai 1	205
V.2.2.1.1	Concentrations de COT et de COD après les traitements et avant incubation (J0)	205
V.2.2.1.2	Evolution des concentrations du COD à T30 et à T35.....	206
V.2.2.1.3	Evolution du carbone organique dissous biodégradable de la solution de tryptone	208
V.2.2.2	Résultats de l'essai 2	209
V.2.2.2.1	Caractérisation des solutions de matière organique.....	209
V.2.2.2.2	Effet du traitement H ₂ O ₂ /UV sur les concentrations de COT et de COD	210
V.2.2.2.3	Evolution des concentrations de COT et du COD après 30 et 35 jours d'incubation.....	212
V.2.2.3	Résultats de l'essai 3	214
V.2.2.3.1	Caractérisation des solutions de matières organiques.....	215

V.2.2.3.2	Effet des traitements H ₂ O ₂ /UV sur les concentrations en COT et COD	216
V.2.2.3.3	Effet du traitement H ₂ O ₂ /U, UV et H ₂ O ₂ sur les concentrations en CODB	217
V.2.2.3.4	Caractérisation des solutions de matières organiques après traitement (UV, H ₂ O ₂ et H ₂ O ₂ /UV) par analyse HPSEC	218
V.2.2.3.4.1	Caractérisation des solutions non traitées	218
V.2.2.3.4.2	Effet du traitement par irradiation UV	219
V.2.2.3.4.3	Effet du traitement H ₂ O ₂	220
V.2.2.3.4.4	Effet du couplage H ₂ O ₂ /UV	221
V.2.2.3.5	Cytotoxicité des solutions de matières organiques traitées	223
V.3	DISCUSSION	224
VI.	CHAPITRE VI : OPTIMISATION DES CONDITIONS D'APPLICATION DU PROCEDE SECUROX : ETUDE EXPERIMENTALE.	233
VI.1	CONTEXTE DE L'ETUDE	233
VI.2	RESULTATS	233
VI.2.1	<i>Adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire</i>	233
VI.2.2	<i>Etude de l'efficacité du procédé SECUROX</i>	235
VI.2.2.1	Conduite des essais	235
VI.2.2.2	Phase 1 : Comparaison d'un traitement continu à 0,1 ppm de ClO ₂ et d'un traitement discontinu à 10 mg/ jour	235
VI.2.2.2.1	Evolution des concentrations de ClO ₂ , de la température et de la conductivité	235
VI.2.2.2.2	Effet des traitements sur les concentrations des indicateurs biologiques du biofilms :	237
VI.2.2.2.2.1	Activité métabolique:	237
VI.2.2.2.2.2	Bactéries cultivables	239
VI.2.2.2.2.3	Bactéries totales	240
VI.2.2.2.2.4	Legionella pneumophila	240
VI.2.2.2.2.5	Amibes	241
VI.2.2.3	Phase 2 : Comparaison d'un traitement continu à 0,05 ppm de ClO ₂ et d'un traitement discontinu à 50 mg/ jour	242
VI.2.2.3.1	Evolution de la température, de la conductivité et des concentrations en ClO ₂	242
VI.2.2.3.2	Effet des traitements sur les indicateurs biologiques du biofilms	243
VI.2.2.3.2.1	Activité métabolique	243
VI.2.2.3.2.2	Bactéries cultivables	244
VI.2.2.3.2.3	Bactéries totales	245
VI.2.2.3.2.4	Legionella pneumophila	246
VI.2.2.3.2.5	Amibes	246
VI.2.2.4	Phase 3 : Comparaison d'un traitement continu à 0,05 ppm de ClO ₂ et d'un traitement discontinu à 25 mg/ jour	248
VI.2.2.4.1	Evolution de la température, de la conductivité et de la concentration en ClO ₂	248
VI.2.2.4.2	Effet des traitements sur les concentrations des paramètres biologiques du biofilm	249
VI.2.2.4.2.1	Activité métabolique	249
VI.2.2.4.2.2	Bactéries cultivables	250
VI.2.2.4.2.3	Bactéries totales	251
VI.2.2.4.2.4	Legionella pneumophila	252
VI.2.2.4.2.5	Amibes	253
VI.2.3	<i>Standardisation des résultats</i>	255
VI.2.3.1	Comparaison de la performance du procédé SECUROX selon la concentration de ClO ₂ injecté en continu 257	257
VI.2.3.2	Comparaison de la performance du procédé SECUROX selon la quantité de ClO ₂ injectée en discontinu ..	259
VI.2.3.3	Comparaison de la performance du procédé SECUROX selon la modalité d'injection d'une même quantité de ClO ₂	261
VI.2.3.3.1	Comparaison d'un traitement continu à 0,05 ppm avec un traitement discontinu à 25 mg/j	261
VI.2.3.3.2	Comparaison d'un traitement continu à 0,01 ppm avec un traitement discontinu à 50 mg/j	262
VI.2.4	<i>Synthèse des performances des traitements biocides</i>	263
VI.2.4.1	En termes d'efficacité	264
VI.2.4.2	En terme de reviviscence	265
VI.3	DISCUSSION	267
VII.	CHAPITRE VII : ETUDE DE L'EFFICACITE DES PROCEDES PEROX ET SECUROX SUR LES BIOFILMS DEVELOPPES DANS DES INSTALLATIONS EN VRAIE GRANDEUR	272
VII.1	CONTEXTE DE L'ETUDE	272
VII.2	RÉSULTATS	273
VII.2.1	<i>Campagne d'essais de 2009</i>	273

VII.2.1.1	Evolution des températures des bassins froids.....	273
VII.2.1.2	Biofilms des supports en place	274
VII.2.1.2.1	Activité métabolique	274
VII.2.1.2.2	Bactéries cultivables	275
VII.2.1.2.3	Bactéries totales	276
VII.2.1.2.4	<i>Legionella pneumophila</i>	277
VII.2.1.2.4.1	Amibes	278
VII.2.1.3	Biofilms récoltés sur substrats artificiels.....	280
VII.2.1.3.1	Activité métabolique	280
VII.2.1.3.2	Bactéries cultivables	280
VII.2.1.3.2.1	Bactéries totales.....	281
VII.2.1.3.3	<i>Legionella pneumophila</i>	282
VII.2.1.3.4	Amibes.....	283
VII.2.1.4	Comparaison des résultats obtenus par les deux techniques d'échantillonnage	283
VII.2.1.5	Comparaison des résultats obtenus par l'analyse de l'eau et l'analyse des biofilms.....	285
VII.2.2	Campagne d'essais de 2010	286
VII.2.2.1	Principales caractéristiques physicochimiques des traitements appliquées	286
VII.2.2.2	Evolution des températures des bassins froids.....	287
VII.2.2.3	Biofilms des substrats en place.....	287
VII.2.2.3.1	Activité métabolique	287
VII.2.2.3.2	Bactéries cultivables	288
VII.2.2.3.3	Bactéries totales	289
VII.2.2.3.4	<i>Legionella pneumophila</i>	289
VII.2.2.3.5	Amibes.....	289
VII.2.2.4	Biofilms récoltés sur substrats artificiels.....	290
VII.2.2.4.1	Activité métabolique	290
VII.2.2.4.2	Bactéries cultivables	291
VII.2.2.4.3	Bactéries totales	292
VII.2.2.4.4	<i>Legionella pneumophila</i>	293
VII.2.2.4.5	Amibes.....	293
VII.2.2.5	Comparaison des résultats obtenus par l'analyse des substrats artificiels et l'analyse des substrats en place 295	295
VII.2.2.6	Comparaison des résultats obtenus par l'analyse de l'eau et l'analyse des biofilms.....	296
VII.2.3	Campagne d'essais de 2011	298
VII.2.3.1	Caractéristiques des traitements.....	298
VII.2.3.2	Evolution des températures des bassins froids.....	299
VII.2.3.3	Biofilms des substrats en place.....	301
VII.2.3.3.1	Activité métabolique	301
VII.2.3.3.2	Bactéries cultivables	302
VII.2.3.3.3	Bactéries totales	303
VII.2.3.3.4	Recherche de <i>L. pneumophila</i> et des amibes	304
VII.2.3.4	Biofilms des substrats artificiels.....	304
VII.2.3.4.1	Activité métabolique	304
VII.2.3.4.2	Bactéries cultivables et bactéries totales	305
VII.2.3.4.3	Amibes.....	307
VII.2.3.4.4	Analyse particulière de la vitesse initiale de colonisation des supports artificiels en tant qu'indicateur de la performance des traitements	308
VII.2.3.5	Explication de la baisse de performance du procédé Perox	311
VII.2.3.6	Comparaison des charges bactériennes respectives de l'eau et des biofilms	312
VII.2.3.7	Comparaison des niveaux de contamination des tours lors de la campagne de 2011 et la campagne de 2010	315
VII.2.4	Discussion	317
VIII.	CHAPITRE VIII : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	322
VIII.1	CONCLUSION	322
VIII.2	PERSPECTIVES.....	328
IX.	BIBLIOGRAPHIE	332
X.	ANNEXES	350
X.1	ANNEXE 1 : LISTE DES FIGURES.....	350
X.2	ANNEXES 2 : LISTE DES TABLEAUX.....	358
X.3	ANNEXE 3 : PUBLICATION ET BREVET.....	360

Résumé

L'implication des tours aéro-réfrigérantes dites « ouvertes », dans les cas de légionellose, demeure à l'heure actuel un problème de santé public malgré la multitude de composés biocides disponibles qui, parfois, sont écotoxiques et appliqués à de fortes concentrations. L'efficacité de la majorité de ces biocides est étudiée vis-à-vis des formes planctoniques des microorganismes.

Cette étude s'intéresse à la mise au point de deux procédés de traitement du risque *Legionella pneumophila* : H₂O₂/UV et ClO₂, avec la prise en compte particulière des communautés microbiennes fixées et notamment des protozoaires qui constituent l'hôte naturel de cette bactérie. La démarche expérimentale adoptée pour l'étude de l'efficacité de ces traitements, s'est appuyée sur des biofilms environnementaux naturellement contaminés par des légionelles et issus d'une source thermale. La caractérisation des légionelles isolées des biofilms de cette source montre le maintien du sérotype 1 de *L. pneumophila* et l'apparition de deux autres sérotypes non reportés dans des études précédentes (sg10 et sg12), avec toutefois une prédominance du sérotype 12. Quel que soit le sérotype, ces souches environnementales se sont avérées plus virulentes vis-à-vis de l'amibe *Acanthamoeba castellanii*, que les souches cliniques de *Lp1* répertoriées. A l'état planctonique elles se sont également avérées très sensibles aux traitements H₂O₂/UV et UV seul.

A l'échelle expérimentale, les deux traitements, H₂O₂/UV et ClO₂, montrent une performance élevée vis-à-vis des biofilms. L'étude a particulièrement mis en évidence le rôle du facteur trophique et de l'adaptation des bactéries au stress oxydatif dans la performance des traitements mais aussi dans l'apparition de la reviviscence. L'application des traitements à des installations en vraie grandeur a permis de conforter les résultats expérimentaux et de mettre l'accent, dans le contexte des sites étudiés, sur les limites de leur efficacité et sur la nécessité d'ajustements des doses appliquées (concentrations des biocides, flux d'irradiation UV, mode d'application) aux particularités des contextes industriels.

Mots clés : *Legionella pneumophila* ; biofilms ; biocides ; Tours aéro-réfrigérantes ; amibes

Abstract

Cooling towers are considered as one of the major sources of *Legionella pneumophila*, the causal agent of Legionnaires' disease. Despite the high number of commercial disinfectants dedicated to it, the *Legionella* threat is still rising especially in connection with cooling towers. The efficacy of most disinfectants is demonstrated on planktonic bacteria while very few studies have been devoted to their effects on biofilms. The main objective of the study was to optimize two treatments dedicated to the control of biofilms in cooling towers, H₂O₂/UV and ClO₂, so as to reduce the risk associated to *Legionella pneumophila* while minimizing environmental damages. Their efficacy was studied against environmental biofilms developed in a hot sulphur spring where presence of *L. pneumophila* is permanent. Their analysis revealed the occurrence of *Lp* serogroups 1 (*Lp1*) and of two serogroups not reported in previous studies that were oriented toward water samples, though (*Lp10* and *Lp12*). The environmental strains we isolated display a higher cytotoxicity and virulence towards the amoeba *Acanthamoeba castellanii* than those of known *Lp1* epidemic strains and a higher sensitivity to UV and H₂O₂/UV.

In the experimental part of the study, ClO₂ and H₂O₂/UV display a high efficacy against biofilms. Furthermore the study showed the role of trophic parameters and of bacterial adaptation to oxidative stress on the performance of the treatments but also on biofilms regrowth. The experiments performed at the industrial scale corroborate the results gained at the pilot scale and

focus on the relationships between the dose and the effectiveness of each treatment. Our results suggest the possibility to apply the process to an industrial scale with necessary adjustments about doses and injection modalities to the context of the considered sites.

Key words: *Legionella pneumophila* ; biofilms ; biocides ; cooling tower ; amoeba

I- Introduction générale

I. Chapitre I : Introduction Générale

Les microorganismes ont longtemps été étudiés selon le mode de vie planctonique et individuel. A l'heure actuelle, la forme de vie sessile est considérée comme le mode de vie dominant des communautés bactériennes en milieux naturels. Ce mode de vie sessile est généralement associé à des supports (surfaces) plus au moins stables sur lesquels les microorganismes se regroupent pour former des feutrages, des agrégats, des biofilms. Ce sont en effet les termes génériques employés pour désigner ce mode de vie qui confère aux microorganismes des caractéristiques particulières. Cette forme de vie, prédominante en milieu naturel, confère en effet aux microorganismes une meilleure résistance aux stress environnementaux auxquels les bactéries sont continuellement soumises.

C'est sur cet angle que nous avons abordé le sujet des traitements biocides vis-à-vis des microorganismes, principalement dans les tours aéroréfrigérantes (TARs). Les traitements biocides pourraient être assimilés à des stress induits par des substances chimiques. Les caractéristiques physicochimiques, physiologiques, et phénotypiques des microorganismes dans les biofilms leur permettent de mieux résister à l'action des biocides. C'est ce point qui est à l'origine des biais liés à l'évaluation des capacités des biocides vis-à-vis des microorganismes en suspension (vie planctonique).

Les biofilms se développent abondamment dans les TARs, notamment dans les TARs dites ouvertes. Ces TARs, par leur mode de fonctionnement, offrent un habitat adéquat et des conditions propices pour le développement des microorganismes. La principale préoccupation liée au développement des biofilms dans les TARs concerne *Legionella pneumophila* (*Lp*) et certaines espèces d'amibes pathogènes. Un autre inconvénient est lié au développement des biofilms dans ces installations et concerne l'entartrage biologique à l'origine d'une baisse du rendement énergétique des TARs. Ce deuxième point ne sera pas abordé dans ce manuscrit.

Legionella pneumophila, bactérie pathogène, trouve en effet des conditions idéales pour sa croissance dans les TARs : les températures élevées et la présence des biofilms contenant des protozoaires qui constituent des hôtes de réplication de *L. pneumophila* et une protection vis-à-vis de l'action des biocides. De plus, le mode de fonctionnement des TARs ouvertes est un facteur de dissémination des aérosols contaminés par cette bactérie, qui, respirée avec les aérosols, peut provoquer la Légionellose, aux conséquences graves chez les personnes fragiles. L'inhalation est en effet le seul mode de contraction de la légionellose décrit à ce jour.

L. pneumophila a été découverte en janvier 1977, par Joseph McDade du « Center for Disease Control » (CDC) lors de ses travaux portant sur l'épidémie de pneumonies qui a frappé les participants à un congrès de l'American Legion à Philadelphie en 1976 (Brenner, 1979). 221 cas de pneumonie dont 34 cas mortels ont été enregistrés lors de cette épidémie largement médiatisée. La bactérie responsable de cette épidémie, nommée *Legionella* en référence aux légionnaires victimes de cette épidémie, a été isolée à partir des poumons de l'un des patients décédés. La source de contamination était le système de climatisation de l'hôtel accueillant les congressistes. La transmission à l'homme se fait via l'inhalation ou l'aspiration d'aérosols contaminés (Brieland *et al.*, 1997) générés par différents types de dispositifs alimentés par les réseaux d'eau potable : robinets, pommeaux de douches, tours aéro-réfrigérantes, nébuliseurs (Atlas, 1999).

Les TARs dites fermées, non concernées par la formation des aérosols et donc par la dissémination des légionelles, sont devenue une alternative aux TARs ouvertes. Néanmoins ces TARs sont énergétiquement peu rentables. Face à l'augmentation de la pression environnementale liée à l'expansion de l'utilisation de ces TARs et des biocides parfois

écotoxiques, il était important de rechercher une alternative à l'utilisation des TARs fermées et des biocides écotoxiques.

Notre travail porte donc sur l'évaluation des performances de deux solutions de traitement : Securox (ClO₂) et Perox (H₂O₂/UV) pour le contrôle du risque *Legionella* dans les TARs. Cette évaluation passe par l'étude des effets de ces biocides vis-à-vis des microorganismes en suspension mais aussi des biofilms. Le biofilm est actuellement reconnu comme le principal habitat de *L. pneumophila*. Les interactions de cette bactérie avec la flore bactérienne et les amibes présentes au niveau des biofilms leur confèrent une meilleure résistance vis-à-vis des biocides. Les interactions des microorganismes sont soumises à de nombreux mécanismes. Ces mécanismes proviennent dans la majorité des cas de la communauté microbienne elle-même : interactions métaboliques, transferts de gènes, transmission de signaux cellulaires entre les différentes espèces... mais d'autres mécanismes sont le résultat de l'intervention de facteurs environnementaux tels que la disponibilité des nutriments, des paramètres physicochimiques et des traitements biocides.

L. pneumophila prend une part intégrale dans ces interactions et mène par conséquent à l'intérieur des biofilms une "vie sociale complexe". Cette complexité provient du mode de vie à l'intérieur des biofilms qui selon certains auteurs sont une source de nutriments pour ces bactéries (Surman *et al.*, 2002). Le biofilm constitue également une barrière protectrice des bactéries vis-à-vis de l'action des traitements de désinfection et sont à l'origine des problèmes de recolonisation après des épisodes de désinfection (Cochran *et al.*, 2000 a). La résistance des biofilms au traitement de désinfection est régie par plusieurs mécanismes dont les plus importants sont la pénétration limitée des molécules, des phénotypes particuliers des bactéries, la dégradation des biocides par les métabolismes microbiens... Pour *L. pneumophila*, la vie intra-amibienne est également un moyen d'échappement à l'action des biocides. Pour toutes ces raisons il était important d'évaluer les performances de ces deux solutions de traitement vis-à-vis des biofilms, et, non seulement vis-à-vis des microorganismes en suspension.

Ce manuscrit se décompose en 7 grands chapitres : une partie bibliographique résumant l'état de l'art sur le sujet, un chapitre Matériels et Méthodes, puis le travail expérimental organisé en quatre parties :

- La première partie est une étude de l'écologie des légionelles dans une source thermale située à Aix-les-Bains. Cette source a par la suite servi d'incubateur de biofilms pour les études expérimentales de l'efficacité des procédés Securox et Perox ;
- La deuxième partie concerne la mise au point expérimentale du procédé Perox pour le traitement des biofilms et son effet sur les différentes fractions du carbone organique ;
- La troisième partie concerne l'optimisation expérimentale des modalités de traitement par le procédé Securox ;
- La quatrième partie est consacrée à l'évaluation des performances de ces deux procédés vis-à-vis des biofilms à l'échelle industrielle.

Enfin, une conclusion générale qui rappelle les principaux résultats des travaux et présente les prolongements qui pourraient lui être donnés clôt ce manuscrit.

II- Synthèse bibliographique

II | Chapitre II : Synthèse bibliographique

II.1 Tours aéro-réfrigérantes (TARs) à voie humide ouverte

Seules les installations dites ouvertes conduisent à des rejets dans l'atmosphère dont les aérosols et des microgouttelettes d'eau respirables. Le principe de fonctionnement de ce type de TARs est basé sur le refroidissement par évaporation (voie humide). Ce sont ces aérosols et microgouttelettes qui sont les vecteurs des légionelles et les principaux modes de contamination. Nous nous intéressons donc dans cette partie uniquement à ce type de TARs.

II.1.1 Définitions

Les tours aéro-réfrigérantes à voie humide sont des échangeurs de chaleur dans lesquels l'eau est refroidie par contact direct avec l'air ambiant. Elles sont principalement utilisées pour le refroidissement de procédés industriels exothermiques et des locaux de grande taille notamment les établissements recevant du public (centres commerciaux, hôpitaux, hôtels...).

Le fonctionnement de ces tours repose principalement sur deux phénomènes physiques, la conduction et l'évaporation, qui permettent le transfert de la chaleur de l'eau à l'air ambiant par le contact direct entre ces deux éléments. Le premier est un transfert de la chaleur sans changement de matière par contact de l'eau chaude avec de l'air plus froid (gradient de température entre l'eau et l'air). Il représente environ 15 à 25% de l'échange total. Le deuxième, est un transfert de chaleur suite au changement d'état des molécules d'eau qui contiennent le plus d'énergie. Ces molécules passent en effet de l'état liquide à l'état gazeux entraînant donc un refroidissement de l'eau.

La quantité d'énergie transférée de l'eau vers l'air dépend du gradient de température entre l'air et l'eau mais aussi du taux d'humidité de l'air. Ce processus physique est dominant dans les tours à voie humide et est responsable de la perte d'eau dans le circuit. Cette perte d'eau par évaporation provoque ainsi une augmentation des concentrations des éléments minéraux et organiques et des agents biologiques dans l'eau en circulation. L'eau de recirculation doit être renouvelée par une purge de déconcentration et un appoint pour compenser l'eau évaporée et contrôler l'entartrage, la corrosion et l'encrassement biologique des tours qui sont à l'origine de la diminution de leur performance.

II.1.2 Principe de fonctionnement

L'eau chaude à refroidir est amenée au sommet de l'installation puis pulvérisée sur les surfaces de ruissellement (figure 1.2) à l'aide de répartiteurs (figure 1.1). Sous l'action de la tension superficielle due aux mailles des surfaces de ruissellement (packing), l'eau s'étale uniformément et ruisselle sur toute leur hauteur, ce qui augmente la surface d'échange avec l'air. L'air est amené par le ventilateur et pénètre par la partie inférieure de la tour. Au contact de l'eau pulvérisée sur les surfaces de ruissellement, il s'échauffe et se sature d'humidité puis s'échappe par la partie supérieure de l'installation. L'eau, refroidie grâce à la ventilation forcée, tombe ensuite dans la bêche de la tour (figure 1.3). Un dispositif pare-gouttelettes ou "séparateur de gouttes" est installé au niveau de la sortie d'air de la tour afin de minimiser l'entraînement vésiculaire et donc la production d'aérosol.

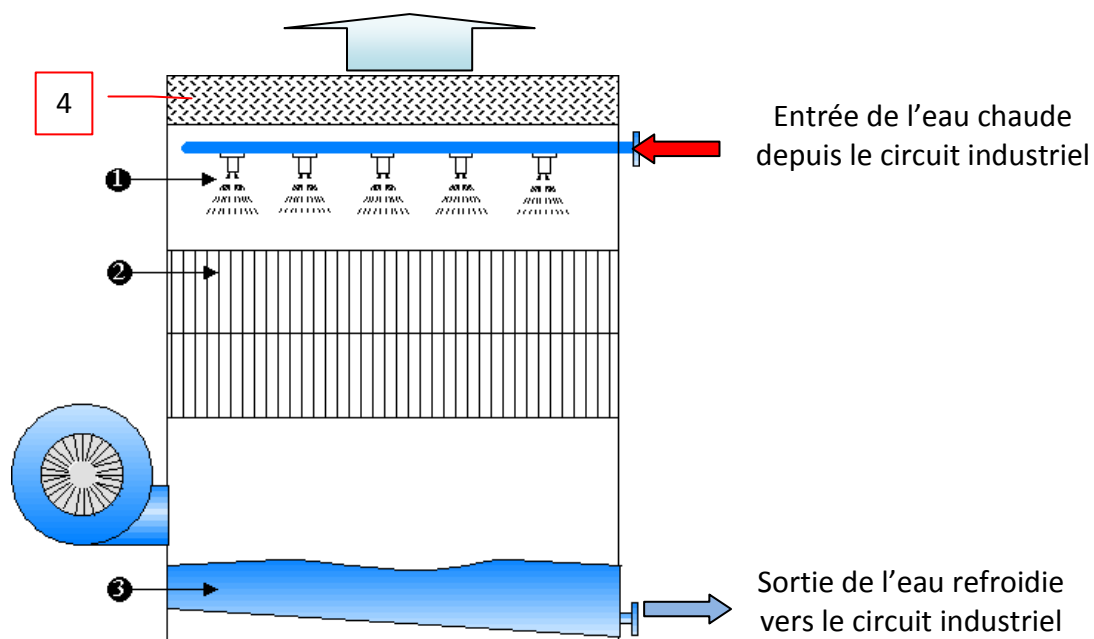


Figure 1 : Schéma d'une tour ouverte (tour à échange direct). (1) répartiteurs, (2) 'packing', (3) bassin incliné, (4) dispositif pare gouttelettes.

Ce principe de fonctionnement induit un lavage de l'air par l'eau refroidie ; ainsi toutes les particules captées dans l'air ambiant se retrouvent dans le circuit d'eau. L'évaporation de l'eau est à l'origine de la concentration d'éléments minéraux et organiques. Il est donc nécessaire de renouveler régulièrement cette eau pour minimiser l'encrassement et le développement microbien. Le volume d'eau utilisé dans certains cas peut donc être important ce qui induit l'utilisation de quantité conséquente de biocides pour la lutte contre les légionelles.

II.1.3 Problèmes d'exploitation liés à la santé publique

Les tours aéro-réfrigérantes à voie humide (TARs ou IRDEFA pour "Installation de Refroidissement par Dispersion d'Eau dans un Flux d'Air") sont le siège d'un développement microbien très important dans l'eau de refroidissement et sur les surfaces immergées des parois internes des tours. Ce développement microbien est principalement dû aux modalités de conception et de fonctionnement de ces installations. Ces dernières, offrent en effet des conditions propices au développement des microorganismes. Ces conditions sont principalement :

- la présence d'eau,
- un gradient de température étendu, résultant de transferts thermiques lors du refroidissement,
- un effet de concentration des matières organiques par l'évaporation. Ces matières organiques sont pour la plupart, une source de nutriments pour les microorganismes et peuvent donc contribuer à leur croissance,
- un grand développement des surfaces immergées, ouvertes au développement des biofilms,
- un lessivage des particules en suspension dans l'atmosphère.

La charge microbienne présente dans les TARs est d'une grande diversité et contient des bactéries, des champignons, des virus et des protozoaires. Parmi eux, les pathogènes pour les humains représentent des risques pour la santé publique, notamment la bactérie *L. pneumophila* et quelques amibes des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba*. Le risque sanitaire lié à la dissémination

dans l'atmosphère d'aérosols contaminés par des légionelles provenant des TARs est clairement démontré (Nguyen *et al.*, 2006).

Pour ces raisons, les TARs sont soumises à une réglementation stricte définie actuellement par l'arrêté du 13/12/04 (arrêté ministériel du 13 décembre 2004 relatif aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air, rubrique 2921) et sa circulaire d'application du 8 décembre 2005.

Ce texte définit les points qui doivent être respectés lors de la conception des installations de refroidissement, le suivi microbiologique des TARs en fonctionnement et les seuils de contamination qui déclenchent des mesures particulières pour la maîtrise du risque sanitaire lié aux légionelles. C'est l'espèce *Legionella pneumophila*, appartenant au séro groupe 1 qui est majoritairement incriminée dans les cas de légionelloses et représente environ 95% des cas de légionellose en France (Doléans *et al.*, 2004). Néanmoins d'autres sérogroupes (sg) ont également été incriminés dans des cas de légionellose, parmi lesquels le sg 3 et le sg 6 principalement. D'autres espèces de légionelles ont également été associées à quelques cas de légionelloses : *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. gormanii* (Reingold *et al.*, 1984 ; Fang Yu et Vickers, 1989).

La légionellose résulte de l'inhalation d'aérosols ou de microgouttelettes d'eau contaminées par des légionelles. Les aérosols et les microgouttelettes produites par l'évaporation de l'eau peuvent contenir des légionelles mais aussi des vésicules d'amibes respirables (de 2,1 à 6 µm) contenant des légionelles.

Le "risque *Legionella*" dans les installations de refroidissement mais aussi dans les spas et les centres hospitaliers est donc un problème de santé publique et ces installations sont le premier lieu d'investigations épidémiologiques lors des épidémies ou dans les cas isolés de légionellose. Un grand nombre de solutions de traitement est présent sur le marché pour la maîtrise de ce risque. Néanmoins, ce risque n'est pas entièrement maîtrisé et des cas de légionelloses sont régulièrement déclarés. Le choix des traitements biocides appropriés reste compliqué notamment après les mesures environnementales qui imposent le contrôle des rejets écotoxiques dans l'environnement.

II.1.4 Populations microbiennes des TARs

Le corps d'échange 'packing' représente lui-même un facteur favorable au développement des biofilms de part la surface développée. Son nettoyage est en outre rendu très difficile de par la nature même de sa structure.

Ces microorganismes sont pour la plupart, à l'origine de problèmes non spécifiques notamment d'encrassement biologique responsable de la diminution du rendement des échanges thermiques, voire du colmatage des échangeurs. Certaines espèces bactériennes sont à l'origine de problèmes spécifiques liés aux traits particuliers de leurs capacités métaboliques qui génèrent des problèmes de santé publique (bactéries pathogènes), et des problèmes de détérioration des installations (bactéries de la corrosion).

La connaissance de la composition des communautés microbiennes qui colonisent les TARs est donc d'un intérêt majeur pour le traitement de ces installations. La grande majorité des études consacrées à l'étude des communautés microbiennes des eaux des TARs sont relatives à des tests de biocides, et concernent des bactéries ou des amibes pathogènes (Cloete *et al.*, 1989 ; Srikanth et Berk, 1993 ; Kusnetsov et Martikainen, 1993) en suspension dans l'eau.

C'est à partir de ces communautés que s'établissent des biofilms. Les communautés microbiennes fixées évoluent ensuite, sous l'effet d'une pression de sélection exercée par les contraintes spécifiques locales, relatives au type de l'installation (nature des parois), à sa puissance, à son mode de gestion et aux traitements de toute nature (biocides, antitartre, anticorrosion) qui lui sont appliqués. Cette pression de sélection, dans la mesure où elle est suffisamment forte, joue très probablement un rôle dans la détermination de la composition et de la diversité des communautés bactériennes des biofilms.

II.1.5 Surveillance microbiologique des TARs

L'arrêté ministériel du 13 décembre 2004 (circulaire d'application du 8 décembre 2005) impose la mise en place d'un protocole de suivi de l'efficacité du traitement de désinfection des TARs qui a été choisi. Du point de vue microbiologique, la seule exigence concerne le dénombrement de *Legionella* ssp selon la norme NF T90-431 par un laboratoire accrédité COFRAC (NF EN ISO/CEI 17025). Il s'agit d'une technique de dénombrement par culture sur milieu solide (milieu GVPC). L'analyse donne donc une concentration de légionelles cultivables exprimée en UFC/L (unité formant colonies par litre d'eau). Les échantillons dans lesquels la concentration en légionelles est avérée supérieure à 100 000 UFC/L sont conservés pendant 3 mois par le laboratoire. La réglementation n'impose pas une fréquence d'échantillonnage ; celle-ci est laissée à l'appréciation de l'exploitant qui doit la choisir de façon à pouvoir mesurer l'efficacité des actions préventives mises en place.

Cependant, la fréquence des analyses de *Legionella* ssp doit être au minimum mensuelle pendant la période de fonctionnement de l'installation. Si les concentrations des légionelles se maintiennent à un niveau inférieur à 1000 UFC/L pendant au moins 12 mois, cette fréquence peut devenir trimestrielle. Lors de l'évaluation de l'efficacité d'un traitement de choc, les prélèvements sont en général réalisés juste avant le traitement choc et dans un délai d'au moins 48 h après ce traitement.

L'identification génomique des souches isolées des TARs n'est pas systématiquement réalisée. Néanmoins elle peut être demandée par l'inspection des installations classées, notamment lorsque des personnes sont atteintes de légionellose. Cette analyse est réalisée par le Centre National de Référence des Légionelles de Lyon (CNRL).

La présence de flores interférentes pourrait rendre impossible la quantification des légionelles. Dans ces cas l'exploitant est tenu à prendre des mesures pour le nettoyage et la désinfection des TARs. La vérification de l'efficacité d'un nettoyage et d'une désinfection est réalisée par une recherche des légionelles dans les deux semaines consécutives qui suivent l'opération. Après une remise en service, une évaluation de la concentration en légionelles est réalisée à 48 h, puis tous les quinze jours pendant les trois mois suivants. Le traitement et la vérification de l'efficacité du traitement sont renouvelés jusqu'à ce que la concentration en légionelles soit inférieure au seuil de 1 000 UFC/L.

Le texte réglementaire impose donc une valeur seuil, en effet les concentrations des légionelles dans l'eau du circuit ne doivent pas dépasser 1 000 UFC/L. A une concentration comprise entre 1000 à 100 000 UFC/L, l'installation doit être nettoyée et désinfectée afin que la concentration passe sous le seuil des 1 000 UFC/L. Au dessus de 100 000 UFC/L, l'installation doit être arrêtée dans les meilleurs délais selon une procédure préalablement définie. Elle doit ensuite être vidangée, nettoyée et désinfectée.

II.1.6 Dispositions à prendre dans le cas d'apparition d'un cas de légionellose

La découverte de cas de légionellose est suivie systématiquement d'une enquête épidémiologique pour déterminer la source de l'infection. La suspicion de la contamination d'une TARs impose à l'exploitant de faire réaliser immédiatement un prélèvement pour la recherche des légionelles et pour déterminer les caractéristiques de l'eau en circulation. Les colonies de légionelles qui pourront être isolées seront transmises au Centre National de Référence des Légionelles de Lyon pour identification génomique. Cette identification est réalisée dans le but de faire un lien entre les souches cliniques isolées des cas de légionelloses et les souches environnementales isolées des TARs. L'incrimination d'une TAR dans des cas de légionellose impose à l'exploitant de nettoyer et de désinfecter l'installation, mais aussi de prendre des mesures préventives plus drastiques pour éviter la réapparition de cas de légionellose.

II.2 Les biofilms

II.2.1 Généralités :

Le biofilm est un ensemble constitué de microorganismes et de particules inertes, de toute nature, minérales ou organiques, inclus dans une matrice essentiellement constituée de polymères et attachée à un support en contact avec de l'eau (figure 2). Il est bien établi maintenant que l'état sessile est prédominant dans la nature et que le biofilm est l'habitat principal de la plupart des microorganismes (Branda *et al.*, 2005 ; De Beer et Stoodley, 2006).

Or la majorité des analyses microbiologiques qui sont pratiquées sur les milieux aquatiques ou sur les circuits des installations industrielles, concernent les bactéries et les protistes en suspension, dits "libres" ou "planctoniques". C'est notamment le cas dans les études relatives à l'efficacité des traitements biocides sur les microorganismes des TARs, dont la plupart sont basées sur des prélèvements effectués dans l'eau (Fliermans et Harvey, 1984 ; Negron-Alvira et Perez-Suarez, 1988 ; Kusnetsov *et al.*, 1993 ; Wery *et al.*, 2008). Ce choix est dicté, encore à l'heure actuelle, par les difficultés techniques de l'échantillonnage et de l'analyse des communautés bactériennes fixées (biofilms).

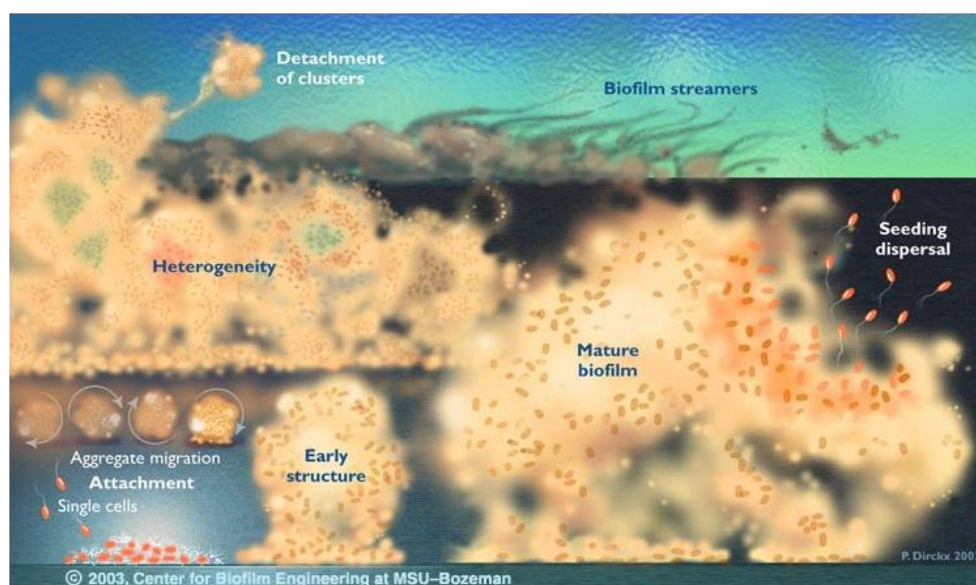


Figure 2 : Structure d'un biofilm au cours des différentes phases de son développement (Center for Biofilm Engineering 2003).

Les bactéries en suspension dans l'eau sont, dans leur grande majorité, issues des biofilms, mais l'image qu'elles donnent de l'état de contamination d'une installation peut être brouillée par le fait que leurs relations avec les populations fixées sont sous la dépendance de multiples facteurs. Pour la plupart, ces facteurs sont ceux qui participent à la dynamique du développement des biofilms, d'où l'intérêt du rappel des principales connaissances à leur sujet qui fait l'objet des paragraphes qui suivent.

Il est à noter que la grande majorité de ces informations n'a pas été acquise spécifiquement à propos des biofilms des TARs. Beaucoup doivent cependant pouvoir leur être appliquées. Pour d'autres caractéristiques des biofilms, par contre, telles que la composition et la diversité des communautés microbiennes, les particularités des TARs, telles que la permanence des traitements, anti tartre, anti corrosion et biocides, laissent supposer une spécificité.

II.2.2 Formation et maturation des biofilms

La formation des biofilms, est un processus complexe qui commence par l'interaction des bactéries planctoniques avec des surfaces en réponse à des signaux environnementaux appropriés. Durant ce processus les bactéries passent d'un mode de vie unicellulaire libre à un mode de vie multicellulaire fixées. La croissance de ces bactéries aboutit à la différenciation cellulaire et à la formation de communautés bactériennes structurées. Les premières avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires de formation des biofilms ont été réalisées chez des bactéries à Gram négatif de la famille des protéobactéries, notamment *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa* (O'Toole et Kolter 1998b ; Pratt et Kolter 1998 ; Watnick et Kolter 1999 ; Watnick *et al.*, 2001)

Les travaux effectués par plusieurs groupes de recherche sur les biofilms permettent la construction d'un modèle de développement hypothétique. Ce modèle peut être généralisé à plusieurs espèces bactériennes et ajusté en fonction des spécificités liées à la mobilité bactérienne.

Les bactéries non mobiles sont généralement entraînées sur les surfaces grâce à des phénomènes physiques tels que l'advection, la diffusion, la turbulence et la convection. En réponse à certaines conditions environnementales (par exemple disponibilité diminuée de nutriments), les bactéries sur-expriment des adhésines sur la surface externe des cellules et augmentent leur viscosité par la synthèse des exo-polysaccharide (EPS). Ceci favorise l'adhérence des cellules à d'autres cellules et aux surfaces (Götz *et al.*, 2002).

Les espèces non mobiles produisent des EPS qui constituent la majeure partie des matrices extracellulaires. L'ensemble des changements opéré au niveau des protéines de surface et la production des EPS joue un rôle prépondérant dans l'initiation de la formation de biofilms (Götz *et al.*, 2002 ; Latasa *et al.*, 2006).

Ces exo-polysaccharides sont des composants essentiels de la matrice du biofilm, néanmoins des données récentes suggèrent que des protéines de surface jouent un rôle principal pendant la construction des communautés microbiennes des biofilms. En effet, dans le cas de certaines espèces de staphylocoques, les protéines de surface tel que Bap (biofilm-associated protein), favorisent les interactions cellule-cellule et contribuent à la structure de la matrice extracellulaire (Lasa et Penades, 2006). La protéine Bap, premier membre de cette famille de protéines, a été décrite chez *Staphylococcus aureus* isolée de mammites bovines. D'autres protéines de surface homologue à Bap et impliquées dans la formation du biofilm ont été décrites chez plusieurs bactéries mobiles ou non mobiles, gram-positives et gram négatives tel que la protéine Esp chez *Enterococcus faecalis* et BapA chez *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis (Latasa *et al.*, 2006).

En réponse à des signaux extérieurs favorisant la formation de biofilm, les bactéries mobiles se dirigent vers les surfaces grâce à leur mobilité. Elles amorcent ensuite des changements physiologiques profonds pour s'adapter à ce nouveau style de vie dit « sessile ». Elles perdent leur mobilité et produisent une matrice extracellulaire permettant l'adhésion aux surfaces et aux autres bactéries. Les flagelles jouent un rôle principal dans l'initiation de la formation du biofilm en assurant la mobilité des bactéries. En effet certaines souches mutantes dépourvues de flagelles perdent leur capacité à former des biofilms. Lemon *et al.* (2007) montrent que la mobilité flagellaire chez *Listeria monocytogenes*, un pathogène alimentaire, est indispensable tant pour l'attachement aux surfaces que pour la maturation ultérieure du biofilm. Chez un mutant non mobile de *L. monocytogenes*, l'apport d'un mouvement cellulaire exogène par centrifugation dirigée vers une

surface rétablit l'adhérence superficielle initiale mais ne restaure pas la maturation du biofilm. O'Toole et Kotler (1998 a) ont également démontré que les flagelles et/ou la mobilité flagellaire est cruciale dans les interactions cellules-surfaces chez *P. aeruginosa*.

La rencontre initiale d'une bactérie avec une surface (figure 3.2) mène généralement à une adhérence passagère (figure 3.3) qui peut aboutir dans certains cas à un retour à un état planctonique (figure 3.4) ou à une interaction stable amorçant le développement d'un biofilm (figure 3.5).

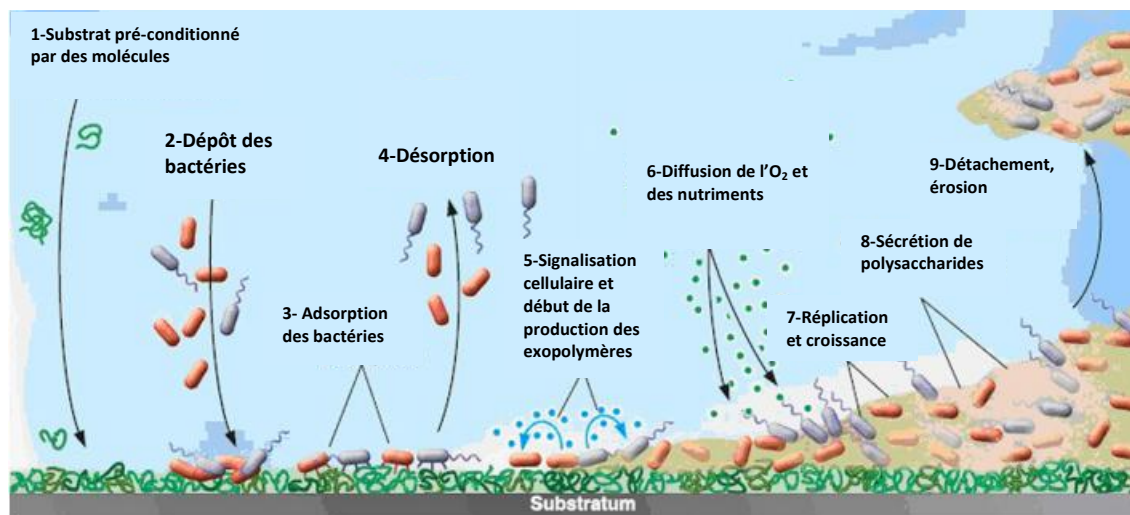


Figure 3 : processus de formation des biofilms (Simoes *et al.*, 2010)

La formation de biofilm peut être divisée en trois étapes successives : l'accrochage, la croissance et la maturation. Ces étapes fournissent un modèle théorique simplifié pour étudier la formation de biofilms par des bactéries. Néanmoins la régulation de ce processus est très complexe et varie d'espèce à espèce. L'attachement initial des bactéries dépend pour nombre d'entre elles, de la mobilité flagellaire. Chez quelques bactéries Gram-négatives, la formation de micro-colonies et l'architecture tridimensionnelle finale dépendent de la mobilité assurée par les pilis de surface de type IV. Ces pilis disparaissent ensuite chez les bactéries adhérees dans le biofilm. Après l'adhésion des cellules, elles produisent une matrice extracellulaire constituant l'élément principal de la structure de biofilms et permettant la construction des structures tridimensionnelles.

II.2.3 La phase d'accrochage

Cette phase se déroule elle-même en deux temps en correspondance avec le caractère réversible ou non de la fixation des bactéries sur le support.

II.2.3.1 Phase réversible de l'accrochage

Cette phase dépend essentiellement de trois facteurs :

- les types des bactéries présentes dans l'eau libre et leur concentration ;
- la concentration des nutriments dissous dans l'eau et/ou adsorbés sur les surfaces ;
- l'hydrodynamique : forces de cisaillement, débit, ...

Dans l'eau libre, les microorganismes sont soumis à des mouvements erratiques via des processus physiques tels que l'advection, la diffusion, la turbulence et la convection. Ceux qui disposent de dispositifs de mobilité (flagelles, cils) peuvent aussi se déplacer mais dans une très faible mesure. Ces mouvements peuvent les amener à intégrer la couche limite, caractérisée par la vitesse nulle du fluide (l'eau ici) avec lequel la surface est en contact. Les microorganismes

rejoignent alors la surface du fait de forces d'attraction passives non spécifiques (gravité, charges électrostatiques) ou en raison du caractère hydrophobe qui caractérise la plupart des bactéries. Les particules inertes de taille similaire sont également concernées par ces forces d'attraction.

A leur arrivée sur la surface, les microorganismes peuvent également être retenus par le jeu de forces ou de liants spécifiques qui, en outre, présentent souvent un caractère irréversible. C'est le cas, notamment, de l'accrochage sur les surfaces organiques vivantes et non vivantes, avec la mise en jeu de composés tels que des lectines, des acides nucléiques, des adhésines, des composants de la capsule des bactéries gram-négatives (polysaccharides), de pilis et plus généralement, de composés dont la géométrie stérique est complémentaire de celle de composés, préalablement adsorbés.

Les pilis sont des structures tubulaires creuses constituées de chaîne hélicoïdales protéiniques (figure 4). Il en existe de plusieurs types, associés à différentes fonctions de la cellule bactérienne. Ceux qui sont impliqués dans les processus d'adhésion des cellules à leurs supports sont aussi appelés fimbriae. L'étude des bactéries pathogènes de l'environnement humain donne des exemples dans lesquels la structure des pilis d'adhésion subit des modifications qui semblent correspondre à l'adaptation de leurs fonctions aux contraintes de l'environnement dans lequel elles s'installent. Il est envisageable que des processus d'adaptation analogues s'établissent au sein des communautés bactériennes des TARs, en liaison avec le maintien de la contrainte que représentent les traitements appliqués aux eaux. Ces processus pourraient expliquer, en partie, la performance de l'accrochage des biofilms dans ces milieux et en aval, la difficulté de leur éradication. La connaissance du détail des mécanismes précoces de l'accrochage des bactéries est l'une des informations clefs des recherches visant à éliminer les biofilms par la mise au point de traitements de surface visant à inhiber les premiers stades de leur développement.

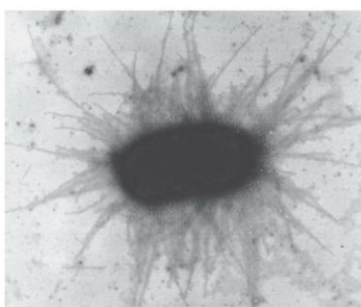


Figure 4 : Cellule d'*E. coli* vue au microscope électronique, entourée de ses pilis (Sharon N. 2006. *Biochim. Biophys. Elsevier Acta* 1760: 527–537)

II.2.3.2 Phase irréversible d'accrochage et phase de croissance

Le facteur principal de l'irréversibilité de l'accrochage des biofilms est la matrice exopolymérique produite par les bactéries elles-mêmes. Cette matrice prend aussi le nom de glycocalyx dans le domaine de l'odontostomatologie, en particulier. Elle représente environ 80% de la matière organique des biofilms. Elle est essentiellement composée de polysaccharides (Sutherland 2001), aussi appelés EPS (chez *P. aeruginosa*, il s'agit principalement d'alginate) qui interagissent avec d'autres macromolécules telles que des protéines (lectines, enzymes tels que des lyases, ou des polysaccharases), des lipides (Wingender *et al.*, 1999) et des acides nucléiques (Whitchurch *et al.*, 2002). La composition des EPS et leurs propriétés fonctionnelles varient considérablement en fonction des microorganismes qui les synthétisent et de leur état physiologique, mais aussi en fonction des conditions environnementales. Le tableau 1 donne un

ordre de grandeur du pourcentage des composés qui les constituent dans le cas d'un biofilm à *P. aeruginosa*.

Tableau 1: Proportions des principaux composants des EPS dans le cas d'un biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* (Flemming *et al.*, 2001).

Composés	Concentration dans les EPS (%)
Polysaccharides	40–95%
Protéines	<1–60%
Acides nucléiques	<1–10%
Lipides	<1–40%

La production des EPS est induite par différents types de signaux tels que le contact avec une surface, le changement des conditions nutritionnelles (Chandy *et al.*, 2001 ; Visick *et al.*, 2005), le pH, la température et les conditions hydrodynamiques. Il a été montré, dans le cas de *P. aeruginosa*, que, les gènes *algC* codant pour la production d'alginate et de lipopolysaccharides, deux constituants de la matrice exopolymérique, sont activés dans les minutes qui suivent le contact avec un support (Davies *et al.*, 1995). La production d'EPS représente pour ces organismes une adaptation aux nouvelles conditions de leur existence (O'Toole *et al.*, 2000).

De nombreux exemples montrent que ce processus peut aussi être sous la dépendance du "quorum sensing", nom donné aux échanges de signaux chimiques qui se produisent entre les bactéries d'une même espèce ou d'espèces différentes, (Garny *et al.*, 2008). Ces échanges ont souvent pour effet de coordonner l'activité métabolique des bactéries vers la synthèse d'un composé particulier (une toxine, par exemple) ou, de façon plus globale, vers la "simple" multiplication cellulaire, ce qui peut expliquer l'accroissement accéléré de la concentration bactérienne constaté lors de phénomènes de reviviscence, par exemple. Dans ce sens, la coordination des processus de production d'EPS permettrait d'une part, d'accélérer le passage du biofilm naissant vers une adhésion irréversible et, d'autre part, l'installation des bactéries dans un environnement qui leur est plus favorable. Le biofilm entre alors dans sa phase de croissance active.

Du fait du confinement relatif de la matrice exo-polymérique, la multiplication des cellules fondatrices n'est pas accompagnée de dispersion et aboutit de ce fait à la constitution de micro-colonies au sein des formes érigées qui s'élèvent au dessus de la surface initiale (figure 5). Ces micro-colonies représentent la structure secondaire du biofilm, la structure primaire correspondant à l'ensemble formé par les cellules et la matrice d'EPS qui les entoure.

Il semble par ailleurs que la construction du biofilm se fasse à travers des processus d'inductions successives. Les bactéries responsables de la construction de la base du biofilm laissent la place à d'autres groupes bactériens pour la construction de la partie érigée du biofilm (Costerton, 2007). Ces formes érigées, parfois complexes et organisées en nid d'abeille par exemple (Baum *et al.*, 2009), donnent au biofilm une structure tertiaire.

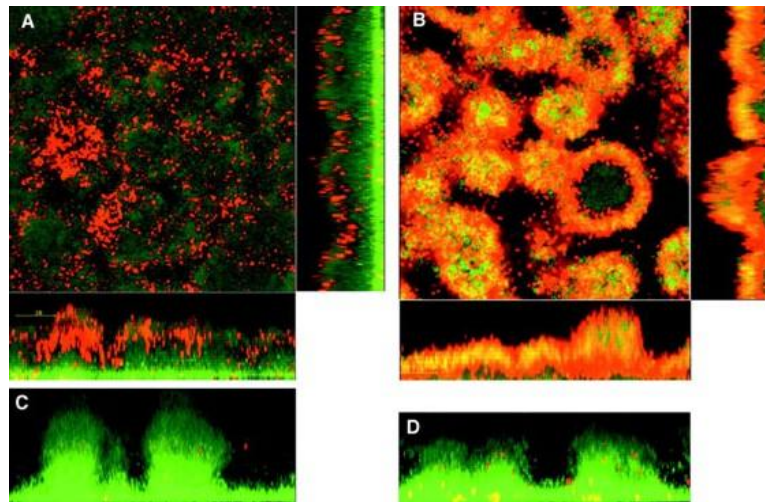


Figure 5 : Images reconstituées de biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 observés au microscope laser confocal montrant le développement en groupes des différentes composantes des communautés bactériennes. Les images rectangulaires qui bordent les images carrées sont celles du biofilm vu en coupe.

La capacité à créer ces structures semble être perdue lorsque les bactéries sont maintenues longtemps en culture pure (Costerton, 2007).

D'autres éléments apportent leur contribution à la structuration des biofilms. Il s'agit de structures protéiniques appelées "nanocables", qui relient certaines cellules entre elles (figure 6) et qui semblent avoir un rôle dans la coordination de l'activité métabolique des bactéries ou dans le transfert de charges électriques d'un point à un autre du biofilm, ou encore, entre le biofilm et son support.

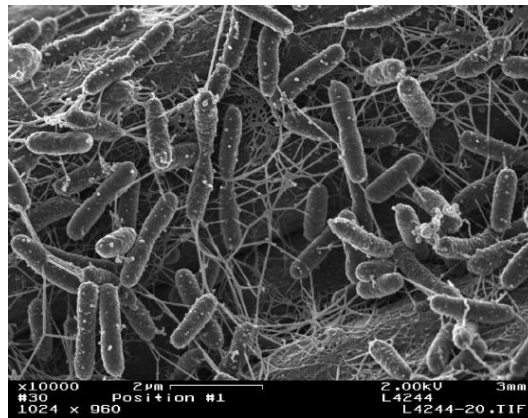


Figure 6 : Photo au microscope électronique à balayage montrant les nanocables qui relient entre elles les bactéries d'un biofilm. Jeff McLean (PNNL), Orianna Bretchger (USC) and Bruce Arey (PNNL).

Durant cette phase de croissance, le biofilm se développe dans les trois dimensions du fait de la multiplication des microorganismes et de la poursuite de la production d'EPS. En prenant de l'ampleur, il perturbe l'écoulement hydrodynamique de l'eau et génère des turbulences qui amènent à son contact les particules en suspension de l'eau libre. Il joue alors le rôle de piège passif vis-à-vis de ces particules, minérales et organiques, qui participent donc ainsi à la construction de l'ensemble. Cette phase conduit à la formation de structures érigées caractéristiques d'un biofilm mature à la base desquelles subsistent des canaux dans lesquels circule de "l'eau libre" grâce à laquelle les colonies sont approvisionnées en oxygène et en nutriments (figure 7).

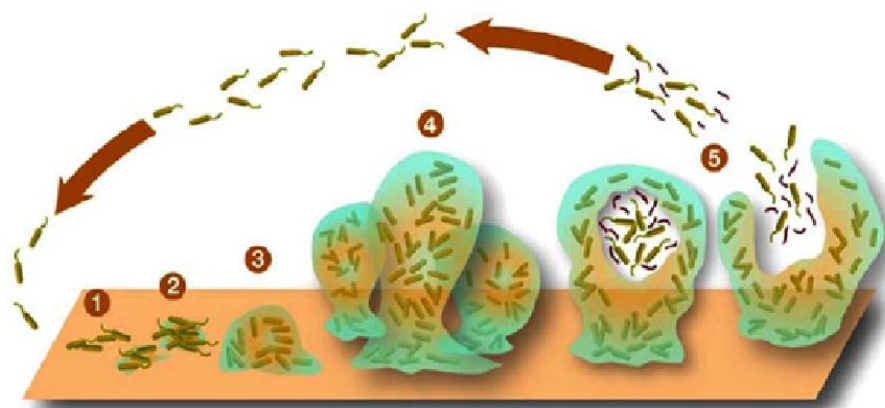


Figure 7. Cycle de développement d'un biofilm (prometheus.mse.uiuc.edu). 1 Colonisation de la surface, accrochage réversible 2 Production d'EPS, accrochage irréversible, 3 et 4 Phase de structuration et de maturation 5 Phase de décrochage passif et actif.

Un 4^{ème} niveau de structuration du biofilm peut être reconnu à travers l'existence d'une certaine stratification des formes érigées. Les régions superficielles sont bien oxygénées grâce à leur contact avec l'eau libre sus-jacente. Les microorganismes situés dans cette région sont généralement plus actifs métaboliquement que ceux des couches profondes qui peuvent, à l'inverse, fonctionner sur la base d'un métabolisme microaéroophile ou anaérobie. Ce constat n'est cependant pas toujours la règle du fait de l'existence des canaux décrits précédemment.

II.2.3.3 Phase de maturité

Le développement du biofilm au dessus de la surface sur laquelle il est fixé, s'accompagne très vite d'un processus inverse, l'érosion, qui a pour conséquence le décrochage de fragments d'EPS et de cellules. Ce processus résulte de la confrontation du biofilm aux forces de cisaillement, liées elles mêmes aux caractéristiques de la circulation de l'eau sus-jacente. Si elles ne sont pas le fait d'évènements accidentels, comme une crue dans un cours d'eau ou un "coup de bélier" dans un réseau, ces contraintes ont des effets multiples sur les mécanismes d'adhésion des cellules, sur la composition et sur la diversité microbienne ainsi que sur la structure physique du biofilm. Rochex *et al.* (2008) montrent ainsi que la vitesse de l'eau favorise certaines espèces microbiennes en fonction de leurs capacités d'accrochage, capacités déterminées par leurs structures membranaires (Rochex *et al.*, 2008 ; Van Houdt *et al.*, 2005) et par la nature des EPS produits.

Une seconde forme d'érosion des biofilms est liée à la capacité de certaines bactéries de quitter le biofilm par un processus de décrochage actif suivi d'un essaimage (Caiazza *et al.*, 2007 ; Verstraeten *et al.*, 2008). Plusieurs facteurs semblent pouvoir être à l'origine de ce phénomène : carences trophiques, relations interspécifiques : effet d'antibiose (Korenblum *et al.*, 2005), communication intercellulaire (Huber *et al.*, 2001), présence de composés toxiques (Ren *et al.*, 2002). L'essaimage proprement dit implique deux processus : la solubilisation de la matrice exopolymérique par des enzymes produits par les bactéries elles mêmes et leur transformation de la forme sessile à la forme planctonique, notamment par la synthèse de flagelles (Harshey, 1994).

Cette phase pose problème sur le plan opérationnel de la gestion des réseaux et des TARs, en particulier par le fait qu'elle correspond à un accroissement considérable de la pression de colonisation exercée par les bactéries sur l'ensemble du réseau, avec la dissémination de fragments

de biofilms et un surcroît de la concentration de cellules isolées circulantes bien adaptées aux conditions spécifiques ambiantes.

Les biofilms ont souvent été étudiés à partir d'une espèce unique ou d'un nombre limité d'espèces bactériennes (Livrelli *et al.*, 1996 ; Sawyer *et al.*, 2000). La complexité et la grande diversité des biofilms "naturels", auxquels les biofilms des TARs peuvent être rattachés, rendent difficile leur analyse (composition spécifique, cinétique de développement) et la construction de modèles de prévision de leur évolution (Noguera *et al.*, 1999 ; Kreft *et al.*, 2001).

II.2.1 Rôle de la matrice exopolymérique

Compte tenu de son importance pour l'unité du biofilm et pour la définition de ses caractéristiques, nous avons choisi de souligner dans ce paragraphe les rôles multiples qui peuvent être attribués à la matrice exopolymérique en reprenant, pour partie, certains des éléments donnés dans les paragraphes précédents.

Les EPS, qui en sont les composants principaux, jouent un rôle important au cours de chacune des phases de développement du biofilm. Comme indiqué précédemment, ils permettent aux bactéries d'adhérer aux surfaces durant la phase initiale de construction du biofilm. Ultérieurement, ils sont responsables de la construction et du maintien d'architectures tridimensionnelles (Massol-Deya, 1995 ; Tolker-Nielsen, 2000 ; Jefferson, 2004).

Les EPS forment un gel poreux grâce auquel l'eau et les nutriments diffusent dans les différentes strates des biofilms (Ophir *et al.*, 1994). La circulation de l'eau est également assurée par les canaux, situés à la base des biofilms et qui de ce fait, assurent également la plupart des échanges d'oxygène, de nutriments, de macromolécules secrétées par les bactéries et de molécules signal sur lesquelles sont basées les communications intercellulaires (Wimpenny, 1997).

La structure et la composition chimique des EPS leur confèrent plusieurs autres propriétés fonctionnelles. Laue *et al.* (2006) ont montré que les polysaccharides pourraient être utilisés eux-mêmes en tant que nutriments par le métabolisme bactérien en cas de carence nutritionnelle. Les EPS jouent également un rôle de protection vis à vis des stress environnementaux (biocides, dessiccation, abaissements de pH, ...). Ainsi, il a été démontré que les bactéries en suspension résistent globalement moins aux stress que les bactéries des biofilms.

Enfin, certains des composants des EPS confèrent aux biofilms une élasticité et une viscosité qui sont des facteurs de résistance aux forces de cisaillement. Selon les contextes, l'effet de ces composants est contrebalancé par l'imprégnation des EPS en calcium qui, en augmentant la compacité et la rigidité de la matrice, contribue à sa stabilité (Mayer *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2002 ; Patrauchan *et al.*, 2005).

II.2.2 Organismes constitutifs et diversité spécifique des biofilms

Les biofilms associent des communautés microbiennes généralement très diversifiées constituées d'organismes procaryotes (bactéries) et eucaryotes (protistes, algues, champignons) (Huq *et al.*, 2008). C'est le cas, en particulier, pour les milieux environnementaux où les biofilms multi-espèces sont prédominants alors que les biofilms mono-espèce sont plutôt rencontrés dans certaines infections et sur les implants chirurgicaux (O'Toole *et al.*, 2000).

Comme dans tout système biologique, c'est l'ensemble des composantes environnementales qui détermine la composition et la diversité des biofilms (Davey *et al.*, 2000 ; Levi *et al.*, 2001). Dans

les conditions naturelles, ces deux caractéristiques peuvent donc être très variables, en raison du facteur saisonnier par exemple, mais elles semblent dépendre plus particulièrement des contraintes physiques telles que les forces de cisaillement (Besemer *et al.*, 2007 ; 2009 ; Rochex *et al.*, 2008). Les auteurs montrent que cette influence concerne tout autant les successions d'organismes phototrophes que celles d'organismes chimiotrophes au sein des communautés microbiennes. Le régime hydraulique (laminaire, transitoire, turbulent) auquel un biofilm est soumis, semble être l'un des principaux facteurs de sa différenciation. Il éloigne les communautés bactériennes d'une composition commune vers laquelle elles convergent lorsque le biofilm évolue vers son état de maturité. Cette même étude suggère que le développement d'algues atténuerait l'effet physique des conditions hydrodynamiques sur les bactéries en homogénéisant les caractéristiques du milieu à l'échelle des microenvironnements (Besemer *et al.*, 2007).

Selon d'autres travaux, chacune des étapes majeures du développement du biofilms peut être associée à un niveau de diversité différent (Jackson *et al.* 2001 ; Martiny *et al.* 2003) :

1. Durant la phase d'adhésion, la diversité du biofilm est généralement élevée car les bactéries s'attachent aux surfaces sans véritable pression de sélection ;
2. Durant la phase de croissance, la diversité diminue suite à la dominance des microorganismes les plus compétitifs ;
3. Durant la phase de maturation, la diversité augmente car l'architecture complexe du biofilm engendre des micro-habitats variés.

Le facteur trophique est lui aussi déterminant pour la composition et la diversité des communautés microbiennes au sein des biofilms (Evans *et al.* 2005 ; Chenier *et al.*, 2006 ; Rochex et Lebeault, 2007). La carence de facteurs nutritionnels ou un déséquilibre trop grand de la proportion des éléments vis-à-vis des exigences stœchiométriques du métabolisme peuvent altérer la diversité des espèces en raison des capacités variables des différentes espèces à supporter ces déséquilibres (Bell *et al.*, 2005 ; Girvan *et al.*, 2005). L'excès d'une catégorie de nutriments dans les apports peut également être à l'origine d'une réduction de la diversité en favorisant un groupe métabolique au détriment d'un autre (Smith, 2007).

La dégradation du facteur trophique (diminution de la concentration en nutriments) et plus généralement des conditions environnementales peuvent être à l'origine de l'apparition de formes de résistance autres que la classique production de spores dont la plupart des bactéries de l'eau n'ont d'ailleurs pas la capacité. Deux formes cellulaires de ce type ont été identifiées dans les biofilms.

La première forme relève d'une stratégie de survie par le jeûne. Elle se traduit par la production d'ultramicro-bactéries ($<0,1\mu\text{m}$), cellules dormantes ou cellules dont le métabolisme est très réduit, dont les exemples ont été trouvés essentiellement dans le milieu océanique et dans les sols profonds (Velimirov, 1994).

La seconde relève d'une stratégie de survie par arrêt de la multiplication. Pour une cellule, le fait de se diviser représente en effet une phase de vulnérabilité vis-à-vis de composés biocides qui ciblent les constituants cellulaires et les métabolites qui participent à ce processus. La stratégie d'arrêt de la multiplication est représentée par la production de cellules appelées persistantes dont l'existence a été mise en évidence, au niveau des strates profondes des biofilms à croissance lente. Il s'agit de cellules dormantes, elles aussi, mais qui ont perdu progressivement leur capacité à se multiplier. De ce fait, elles présentent des résistances multiples vis-à-vis de composés biocides tels que les antibiotiques et certaines toxines (Keren *et al.*, 2004 ; Lewis, 2008). Pour ces cellules, la

perte de la capacité à se multiplier est momentanée : elles peuvent la récupérer lorsque les conditions redeviennent favorables et contribuer alors à la reconstitution du biofilm.

De nombreuses bactéries pathogènes (*P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*) expriment leur caractère infectieux à travers la constitution de biofilms plus ou moins mono-espèce, ce qui se traduit par des infections ou des inflammations chroniques. Les biofilms des milieux environnementaux, et plus particulièrement ceux qui se développent dans les installations humaines, peuvent accueillir certaines de ces bactéries pathogènes et leur offrir des conditions de survie (Ronner *et al.*, 1993 ; Camper *et al.*, 1985). Leur proportion dans les biofilms reste généralement très faible. Certaines peuvent, par contre, y trouver des conditions favorables à leur multiplication. C'est le cas notamment de *Legionella pneumophila* lorsqu'elle trouve dans les biofilms des hôtes (amibes, par exemple) nécessaires à sa multiplication intracellulaire.

II.2.3 Mécanismes de résistances des biofilms au stress environnementaux et aux traitements de désinfection

A l'état libre les bactéries disposent de plusieurs mécanismes qui leurs permettent de contrer l'effet des agents antimicrobiens (antibiotiques, biocides...) :

- pompes d'efflux grâce auxquelles certains agents antimicrobiens sont rejetés à l'extérieur de la cellule ;
- structures membranaires qui donnent une certaine étanchéité à la cellule vis à vis de composés du milieu environnant ;
- production d'enzymes ou d'autres types de molécules qui dégradent ou interfèrent avec l'agent antimicrobien utilisé et l'empêche ainsi d'exercer son effet ;
- acquisition de nouveau matériel génétique qui code pour des fonctions de résistance.

Certains mécanismes de résistances se développent aussi en liaison avec le fait d'appartenir à un biofilm et s'ajoutent aux mécanismes que possèdent les microorganismes à l'état libre.

II.2.3.1 Limitation de la diffusion des molécules antimicrobiennes

Il a ainsi été observé que la matrice du biofilm est une véritable barrière qui ralentit la diffusion des composés antimicrobiens vers les cellules des strates inférieures, notamment les biocides chimiques, les antibiotiques cationiques et les peptides antimicrobiens (De Beer *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1996). Ce mécanisme semble être dû à la composition des EPS et à l'interaction de certains de leurs constituants avec les agents antimicrobiens plutôt qu'à leur quantité (Schulte *et al.*, 2004). Le ralentissement de la diffusion de ces composés à travers les EPS est lié au nombre de sites (récepteurs) présents dans la matrice polysaccharidiques et auxquels les molécules antimicrobiennes se lient. Ce mécanisme de résistance atteint donc ces limites quand ces récepteurs sont saturés et notamment lors d'une très longue durée d'exposition.

Al Fattani *et al.* (2004) ont montré par ailleurs, que la vitesse de diffusion d'un antifongique dans un biofilm multi espèces est nettement plus faible que celle qui peut être mesurée dans un biofilm mono-espèce. Ce résultat peut être rapproché de l'observation selon laquelle l'association de plusieurs espèces au sein d'un biofilm semble augmenter la proportion de cellules viables et la constitution de zones au niveau desquelles le métabolisme bactérien est particulièrement actif. De Beer *et al.* (1994) montrent dans une autre étude que la concentration du chlore dans un biofilm reconstitué de *P. aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* ne représente que 20% de la concentration

mesurée dans le liquide entourant le biofilm. Ils montrent dans la même étude que le chlore diffuse mieux dans les zones non ou peu métaboliquement actives.

Un autre cas intéressant d'une barrière de diffusion qui permet de protéger les cellules a été décrite avec le peroxyde d'hydrogène. Contrairement aux cellules planctoniques de *P. aeruginosa*, très sensibles à la destruction par 50 mM H₂O₂, les cellules du biofilm sont plus résistantes bien qu'elles possèdent un niveau plus faible de catalase (*katA*) dégradant le peroxyde d'hydrogène (Elkins *et al.*, 1999). Une pénétration limitée de cette petite molécule couplée à sa destruction par les cellules microbiennes est apparemment responsable de cette résistance (Stewart *et al.*, 1999).

La résistance des biofilms pluri-espèces a également été observée dans le cas d'autres agents antimicrobiens et notamment vis à vis d'agressions mécaniques telles que les forces de cisaillement (Simoes *et al.*, 2009).

II.2.3.2 *Coopération métabolique et interactions microbiennes*

Du fait de leur vie communautaire au sein d'un biofilm, les bactéries sont soumises à des interactions inter et intra-espèces complexes et variées (Simoes *et al.*, 2007 ; Berry *et al.*, 2006). Ces interactions semblent participer à la résistance prononcée des cellules fixées aux agressions chimiques grâce, par exemple, à des processus de coopération métabolique responsable de la dégradation des composés antimicrobiens. Sutherland rapporte l'existence de tels processus au sujet de la dégradation de composés xénobiotiques (Sutherland, 2001).

La concentration cellulaire elle-même, lorsqu'elle est élevée, semble également contribuer à l'effet protecteur vis à vis des stress environnementaux, notamment par les agents chimiques de désinfection (Chandy *et al.*, 2001). Ainsi l'expression du gène *rpoS* qui participe à la résistance bactérienne en cas de stress est accrue lorsque la concentration cellulaire est forte (Mah et O'Toole, 2001).

Par ailleurs, certaines bactéries bénéficient d'une protection vis-à-vis des biocides grâce à leur capacité à se multiplier au sein de cellules eucaryotes, telles que les amibes par exemple. C'est le cas de *L. pneumophila* (*Lp*) qui est alors protégé, dans une certaine mesure, des effets des biocides utilisés notamment dans les TARs. Il a été montré également que le passage de *L. pneumophila* dans les amibes ou dans des macrophages accroît sa résistance aux antibiotiques (Barker *et al.*, 1995).

Enfin, les échanges génétiques horizontaux sont favorisés par le fait qu'au sein des biofilms, les microorganismes sont proches les uns des autres. Ces échanges peuvent conférer à des cellules une résistance à des composés antimicrobiens via le transfert de matériel génétique responsable de cette résistance (Davey *et al.*, 2000 ; Mah et O'Toole, 2001 ; Molin *et al.*, 2003).

II.2.3.3 *Réduction du taux de croissance*

La majorité des molécules antimicrobiennes sont plus efficaces sur des cellules métaboliquement actives. D'ailleurs, certains antimicrobiens ont comme cible certaines réactions métaboliques essentielles et leur efficacité est proportionnelle aux taux de croissance des cellules cibles. Une réduction du taux de croissance contribue donc à la résistance du biofilm aux traitements antimicrobiens (Stewart *et al.*, 2002 ; Walters *et al.*, 2003). La réduction du taux de croissance pourrait être liée à la limitation en oxygène. Plusieurs études ont en effet démontré un lien entre cette limitation en oxygène, l'activité métabolique et l'efficacité des antibiotiques. Ainsi Walters *et al.* (2003) supposent que la limitation d'oxygène limite l'activité métabolique des biofilms et augmente par conséquent leur résistance.

II.2.3.4 Bactéries dites persistantes « Persisters »

Ce phénotype microbien a été décrit pour la première fois par Joseph W. Bigger de Trinity College (Dublin, Ireland). Il a démontré en effet que suite au traitement d'une population de staphylocoques par la pénicilline, une fraction de cette population résiste à ce traitement. Bigger démontre également que la croissance (reviviscence) de cette fraction de population appelée « persisters » aboutit à une population indissociable de la population originale et présente une sensibilité similaire à la pénicilline. Elle est à son tour pourtant capable de produire de nouveau une fraction de « persisters ». La présence d'une fraction de bactéries résistantes aux traitements par des biocides ou par des antibiotiques a également été démontrée par d'autres études : par exemple, Brooun *et al.* (2000) montrent que la majorité des cellules d'un biofilms de *P. aeruginosa* sont éradiquées par des faibles concentrations d'antibiotique. Une fraction des cellules survit néanmoins à ce traitement et des augmentations de concentration de cet antibiotique n'ont pas permis de l'éradiquer.

C'est à cette catégorie de bactéries dites persistantes que sont rattachées des cellules caractérisées par le fait qu'elles ne se multiplient pas, tout en restant métaboliquement actives (Lewis, 2005). Cet état, observé surtout dans des biofilms associés à des pathologies humaines (Keren *et al.*, 2004 ; Roberts et Stewart, 2005), serait dû à de profondes modifications dans l'expression génique qui auraient amené ces cellules à dévier significativement de leur phénotype sauvage d'origine. Ces cellules présentent une multi résistance aux agents biocides et seraient à l'origine de la reviviscence des biofilms après l'arrêt d'un traitement. Lewis *et al.* (2001) suggèrent qu'il existe un lien entre la tolérance des biofilms aux traitements antimicrobiens et le programme de mort cellulaire. L'hypothèse proposée, est basée sur le fait que les molécules antimicrobiennes ne sont pas directement responsables de la mort cellulaire mais induisent des dommages cellulaires qui déclenchent le programme de mort cellulaire. Lewis *et al.* (2001) proposent que les « Persisters » se maintiennent après les traitements antimicrobiens suite à la défection du programme de mort cellulaire.

La figure 8 résume le mécanisme de résistance des biofilms assurée par la fraction de cellules « Persisters ».

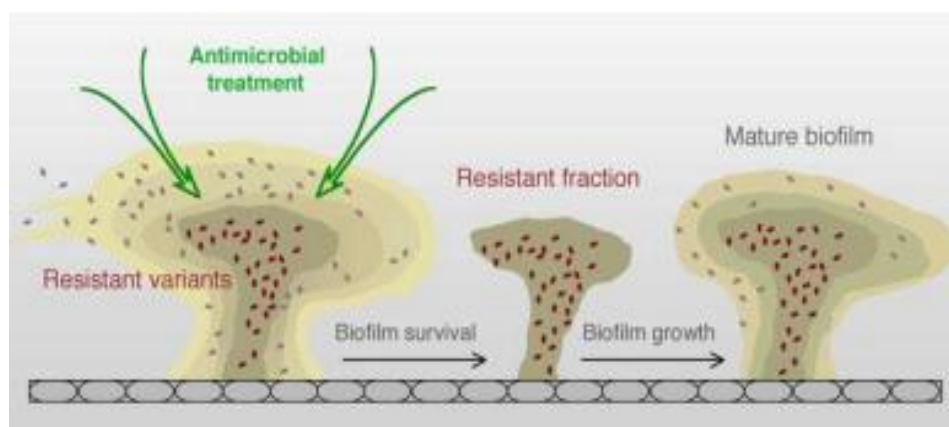


Figure 8 : Implication de la fraction de bactéries dite « Persisters » dans la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens selon Drenkard (Drenkard *et al.*, 2003)

La présence de cette fraction cellulaire dite « Persisters » a été définie comme un trait phénotypique. Ce phénotype est responsable de la résistance aux antibiotiques chez *E.coli* par la mise en œuvre d'un mécanisme appelé MDR (multidrug resistant). Des études récentes ont

démontré l'implication d'éléments génétiques spécifiques dans ce mécanisme de résistance notamment le gène *glpD* (*sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase) dont la surexpression augmente la tolérance de cette bactérie vis-à-vis de l'ampicilline et de l'ofloxacine en phase stationnaire. La délétion de ce gène ainsi que les gènes *glpABC* (*sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase) et *plsB* (*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase) diminue la fraction cellulaire persistantes (Spoering *et al.*, 2006).

II.2.3.5 Quorum-sensing

Le quorum sensing, ou la signalisation inter cellulaire joue un rôle prépondérant dans la formation des biofilms. L'expression de certains gènes bactériens est régulée par le quorum sensing. Ce système de signalisation, qui dépend en grande partie de la densité cellulaire est assuré par des molécules chimiques appelées auto-inducteurs produites par les bactéries. Plusieurs familles d'auto-inducteurs ont été décrites, parmi lesquelles deux familles retrouvées fréquemment chez de nombreuses espèces bactériennes : les auto-inducteurs de type 1 (AI-1) produites essentiellement chez des espèces Gram-négatives appartenant aux protéobactéries (de Kievit *et al.*, 2000 ; Whitehead *et al.* 2001) et les auto-inducteurs de type 2 (AI-2) plus universels et dont la découverte est plus récente (*Vibrio harveyi*) (Surette *et al.*, 1999). Ces deux types de molécules signal sont produits à partir d'un substrat commun : la S-adénosylméthionine (Xavier *et al.* 2003).

Les AI sont synthétisés à l'intérieur des cellules puis sécrétés dans l'environnement extérieur. La concentration des molécules signal est proportionnelle à la densité de la population bactérienne. Lorsque la concentration de ces molécules atteint un seuil critique, elles sont ré-internalisées et se lient ensuite à des régulateurs de transcriptions. Cette liaison est suivie d'une activation ou répression de l'expression de gènes cibles (Miller et Bassler, 2001). Ainsi, le quorum sensing permet aux bactéries de produire une réponse commune dont les bénéfices sont partagés par toute la population microbienne (Smith *et al.*, 2004). Le quorum sensing joue un rôle dans l'accès aux nutriments des niches écologiques les plus favorables. Il renforce également la lutte contre les bactéries concurrentes et contre les stress environnementaux. Plusieurs fonctions cellulaires se trouvent alors modulées par ce système, parmi lesquelles : la symbiose, le transfert de plasmides conjugatifs, la sporulation, la synthèse de peptides antimicrobiens, la régulation de la virulence et la formation de biofilm. Chez *P. aeruginosa* l'expression des facteurs de virulence, le facteur sigma RpoS et la différenciation des biofilms sont contrôlés par le 'quorum sensing' (Drenkard *et al.*, 2003). Le rôle du quorum sensing dans la résistance des biofilms reste cependant pour une grande part inconnu, c'est son rôle global dans la formation et la différenciation des biofilms qui suppose son implication dans la résistance aux stress environnementaux et à l'action des molécules antimicrobiennes.

II.2.3.6 Réponses adaptatives aux stress environnementaux

L'activation des réponses adaptatives aux stress environnementaux permet d'augmenter la résistance des bactéries vis-à-vis de ces stress mais aussi vis-à-vis des molécules antimicrobiennes. Le facteur sigma alternatif (*rpoS*) est décrit comme régulateur général des réponses adaptatives en activant l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la survie des bactéries dans des conditions de stress. Cochran *et al.* (2000 b) ont néanmoins démontré que *rpoS* n'est pas impliqué dans la résistance à la monochloramine et ne contribue pas significativement (il contribue d'une façon transitoire) à la résistance au peroxyde d'hydrogène.

Les bactéries possèdent plusieurs régulateurs qui permettent de s'adapter aux stress environnementaux et réparer les dommages qui en résultent notamment en cas de stress oxydatif et de radiation UV. Cette régulation dépend des conditions environnementales, notamment l'aérobiose, la présence de peroxyde d'hydrogène exogène ainsi que la présence d'autres espèces chimiques dérivées de l'oxygène tel que le radical superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyle (OH^\bullet). (Chiang *et al.*, 2012).

P. aeruginosa possède deux enzymes, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD) responsables de la détoxification de l' H_2O_2 et des radicaux O_2^- respectivement et dont l'expression est modulée par deux protéines régulatrices OxyR et SoxS en réponse au stress oxydatif.

Chez *Escherichia coli*, les mécanismes sont similaires. Elle possède 3 SOD (MnSOD, FeSOD, et CuZnSOD) codées par les gènes : *sodA*, *sodB* et *sodC* et deux catalases appartenant à la famille des peroxydases : hydroperoxydase I (HPI) et II (HPII) codées par les gènes *katG* et *katE*. L'expression des gènes de la catalase et de la SOD est contrôlée par les deux facteurs de transcription majeurs du stress oxydatif : OxyR et SoxR. OxyR contrôle l'expression de plus de 40 gènes et SoxR celle de plus 100 gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et qui protègent les cellules bactériennes vis-à-vis de la toxicité des ROS. La protéine Rpos (facteur sigma alternatif), intervient également dans le stress oxydatif, mais d'une façon transitoire dans le cas des biofilms de *P. aeruginosa* (Cochran *et al.*, 2000 b).

En présence de doses sub-létales d' H_2O_2 ou des ROS, l'expression des gènes impliqués dans la détoxification, en l'occurrence la catalase et la SOD, et la réparation des dommages du stress oxydatif sont induits (Aslund *et al.*, 1999). Les gènes et les mécanismes de la réponse au stress oxydatif ont largement été étudiés chez *E. coli*, mais des homologues ont été décrits chez d'autres espèces bactériennes (Chiang *et al.*, 2012). Elkins *et al.* (1999) ont étudié le rôle de la catalase dans la résistance des biofilms de *P. aeruginosa* au peroxyde d'hydrogène. Leur étude montre que les biofilms sont plus résistants à l'action du peroxyde d'hydrogène que les bactéries planctoniques. L'exposition des biofilms à 50 mM d' H_2O_2 pendant 20 min induit une surexpression du gène *KatB* (homologue de *KatG* chez *E. coli*), impliqué dans la réponse au stress oxydatif. Ces résultats montrent que le biofilm a une capacité d'adaptation rapide à la présence d'oxydants (Elkins *et al.*, 1999). À faible concentration d'oxydants, l'expression constitutive du gène *KatA* est responsable de la résistance des biofilms au stress oxydatif. À forte dose d'oxydants, la surexpression de *KatB* est induite, permettant ainsi aux biofilms de résister à des concentrations sublétales d' H_2O_2 .

Les bactéries sont également capables de déclencher des mécanismes de résistance aux radiations UV, ces principaux mécanismes sont la réponse SOS et la photoréactivation (Zimmer *et al.*, 2007 ; Aslund *et al.*, 1999 ; Chiang *et al.*, 2012).

La figure 9 présente un schéma récapitulatif des principaux mécanismes de résistance des biofilms (*P. aeruginosa*) aux substances antimicrobiennes.

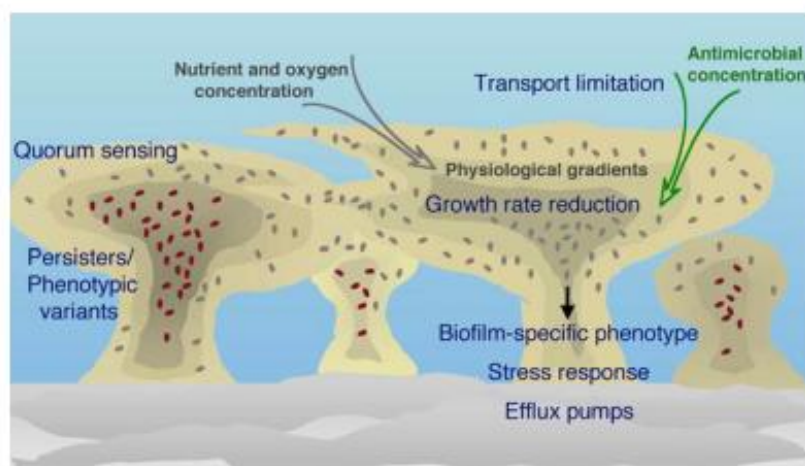


Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la résistance des biofilms de *P. aeruginosa* aux molécules antimicrobiennes (Drenkard *et al.*, 2003)

Il existe très probablement d'autres mécanismes de résistance aux stress environnementaux et aux substances antimicrobiennes dans les biofilms, notamment les pompes d'efflux (Lewis, 2001). Il est souhaitable que les recherches se poursuivent à leur sujet pour la mise au point de techniques de traitement efficaces (Stewart *et al.*, 2002) et, en aval, pour les adapter aux mieux aux conditions réelles.

II.2.4 Spécificité des biofilms des TARs

II.2.4.1 Facteurs susceptibles d'induire une spécificité des biofilms des TARs

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'induire une spécificité des communautés microbiennes dans les biofilms des TARs. Ces facteurs sont essentiellement liés au type technologique auquel se rattache l'installation (puissance, gradient de température, hydrodynamique, forces de cisaillement), mais aussi aux traitements chimiques et physiques appliqués aux eaux (désinfection, notamment).

Dans tous les écosystèmes, la température est un paramètre essentiel qui, pour certaines valeurs, peut prendre un caractère sélectif pour le développement microbien. Le gradient thermique de l'eau des TARs varie d'une installation à une autre et dépend aussi, pour partie, des variations saisonnières. La plage des variations passe cependant toujours par les températures optimales de groupes microbiens inféodés aux animaux à sang chaud dont la prolifération peut représenter un danger potentiel pour l'homme. C'est le cas des légionelles dont l'optimum de croissance est de 35 à 37°C (Mauchline *et al.*, 1992). Le facteur thermique n'est cependant pas le seul en cause. D'autres genres tels que *Pseudomonas*, prolifèrent aussi dans les TARs sans avoir d'exigence marquée vis-à-vis de la température.

L'hydrodynamique influence également la composition microbiologique des communautés microbiennes fixées dans les TARs, notamment à travers les forces de cisaillement qui règlent l'épaisseur des biofilms et exercent une sélection des microorganismes en liaison avec les dispositifs qu'ils mettent en œuvre pour résister à l'érosion. C'est le cas des amibes du fait de leur hydrodynamisme et, indirectement, de *L. pneumophila* qui peut trouver protection dans son hôte en liaison avec sa capacité à se multiplier à l'intérieur de ces protistes.

Les exploitants des TARs sont tenus de respecter les normes microbiologiques correspondantes aux circuits de refroidissement. Ils utilisent pour cela des procédés de traitement chimique ou physique pour la désinfection des eaux dont l'action n'est pas spécifique à un groupe particulier de microorganismes. Ces derniers peuvent cependant développer des résistances variables vis-à-vis de ce stress (Srikanth *et Berk*, 1993 ; Morton *et al.*, 1998 ; Gilbert *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2002). Par ailleurs, les microorganismes libres sont moins résistants que les microorganismes sessiles (Morton *et al.*, 1998 ; Sanli-Yurudu, 2007). Il en résulte que les produits de traitement ont une action inégale sur les microorganismes des TARs et qu'ils sont, de ce fait, à l'origine d'une sélection vis-à-vis de ceux qui sont les plus résistants. Ces produits sont utilisés dans le but de réduire le risque légionelles vis-à-vis duquel, en effet, la plupart se montre efficace, mais là encore, avec de grosses différences entre les bactéries planctoniques et les bactéries fixées (Gilbert *et al.*, 2002 ; Keevil *et al.*, 1990 ; Viera *et al.*, 1999). C'est la présence de la matrice du biofilm et la capacité des légionelles infectantes à se multiplier à l'intérieur des amibes qui les protègent de l'action des biocides.

II.2.4.2 Composition des communautés microbiennes des TARs

Rares sont les études dans lesquelles les caractéristiques de l'ensemble des communautés bactériennes de l'eau des TARs sont prises en considération (Brözel et Cloete, 1992 ; MacDonald et Brözel, 2000). Dans leur grande majorité, les études effectuées sur les TARs s'intéressent uniquement à la composition des communautés microbiennes en suspension et elles ne concernent que les représentants de genres potentiellement pathogènes, *Legionella* et *Pseudomonas* essentiellement. La bibliographie n'apporte pas d'éléments tangibles relatifs à une spécificité des populations bactériennes des TARs dans leur ensemble. De plus, cette observation doit être modulée par le fait que l'image de la diversité des populations des TARs, donnée par les études qui lui ont été consacrées, est probablement biaisée du fait de la variété des traitements qui leur sont appliqués. Wery *et al.* (2008) ont cependant montré, dans le cas de *L. pneumophila*, que la concentration des bactéries revient à son état initial si le traitement (dans le cas de leur étude, l'isothiazolone à une concentration comprise entre 100 et 250 ppm) est arrêté.

Les groupes qui sont rencontrés dans les TARs sont donc comparables à ceux observés dans les autres écosystèmes naturels et sont constitués de virus, de bactéries, d'algues, de champignons, de protistes. La diversité des bactéries en suspension (bactéries "planctoniques") est généralement faible. Elle peut augmenter de façon transitoire en liaison, semble-t-il, avec des épisodes de décrochage de fragments de biofilms. Il a été montré, par contre, que la diversité des légionelles isolées à partir de l'eau peut être importante (Ragull *et al.*, 2007) et qu'elle peut présenter des variations saisonnières (Fliermans *et al.*, 1981) en correspondance avec une saisonnalité des infections qui lui sont liées. Les concentrations plus importantes durant les mois d'été semblent être liées à la combinaison de fortes températures avec un usage plus important des TARs.

Dans différentes études, il est fait état de relations inconstantes, et donc probablement complexes, entre les légionelles et les autres composantes des communautés bactériennes (Yamamoto *et al.*, 1992 ; Devos *et al.*, 2005). Ces relations peuvent d'ailleurs s'établir indirectement par le biais de facteurs qui stimulent le développement amibien, par exemple (Wadowsky *et al.*, 1991). C'est à un niveau plus spécifique que des relations plus constantes ont été observées, bien que très dépendantes des conditions de culture. Cotuk *et al.* (2005) montrent ainsi que des représentants du genre *Pseudomonas* stimulent la croissance de *L. pneumophila* dans les conditions artificielles de milieux de culture, alors que les bactéries du genre *Aeromonas* l'inhibent. Les auteurs

suggèrent que de telles interactions participent à la régulation du développement de *L. pneumophila* dans les conditions réelles des installations humaines. De fait, il a été montré que *P. fluorescens* inhibe la formation de biofilms et induit le détachement de *Legionella* grâce à la production d'une grande quantité de molécule ressemblant aux bactériocines (BLS : Bacteriocine like substance ». Un effet antagoniste similaire mais plus faible est également observé avec *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *P. putida*, *Aeromonas hydrophila* et *Stenotrophomonas maltophilia*. A l'inverse *Acinetobacter lwoffii* qui ne produit pas de BLS est capable de stimuler fortement les biofilms de *L. pneumophila* (Guerrieri et al., 2008).

La concurrence peut également s'établir entre *L. pneumophila* et d'autres espèces de légionelle : Wery et al. (2008) observent ainsi une diminution significative de la diversité au sein du genre *Legionella* après une phase de prolifération de *L. pneumophila*, ce qui suggère un effet antagoniste de cette dernière vis-à-vis des autres espèces de légionelles.

L'enjeu du traitement des biofilms des TARs n'est pas limité au danger que représente la prolifération de *L. pneumophila* et d'amibes pathogènes. Il doit maintenant être étendu à des espèces considérées comme pathogènes émergents. C'est le cas notamment de mycobactéries dites "non tuberculeuses" ou "atypiques", dont la présence dans les TARs est maintenant démontrée et qui peuvent être disséminées par des aérosols, tout comme *L. pneumophila* (Black et al., 2003 ; Pagnier et al., 2009). Les affections dont elles sont responsables touchent essentiellement des personnes immunodéprimées mais parfois aussi, des personnes sans prédispositions apparentes.

II.2.4.3 Cas particulier de *Legionella pneumophila*

Les légionelles sont des bactéries à Gram négatif très largement répandues dans l'environnement hydrique naturel (lacs, rivières, étangs, limons, boues, sols humides...) mais aussi dans les systèmes construits par l'homme (réseaux d'eau potable, douches, fontaines, TARs...). Les légionelles sont plus résistantes à la température que la plupart des bactéries hétérotrophes. Ainsi, *L. pneumophila* se multiplie préférentiellement entre 25 et 42°C, mais est capable de survivre entre 4 et 60°C. L'une des méthodes les plus efficaces pour limiter la colonisation des circuits d'eau par les légionelles est de maintenir une température inférieure à 20°C ou supérieure à 55°C (O'Neill et Humphrey, 2005).

L'environnement aquatique et la température sont donc deux des facteurs essentiels au développement des légionelles. Le troisième facteur principal est le fer, nécessaire à *L. pneumophila* (et *Legionella spp*) comme cofacteur de réactions enzymatiques. C'est pourquoi, les milieux de culture développés pour les légionelles sont supplémentés en fer. L'ion fer est essentiel à la réplication extracellulaire de *L. pneumophila* et à sa virulence c'est-à-dire à son cycle infectieux intracellulaire. Starckenburg et al. (2004). ont montré, qu'elle est capable de synthétiser au moins trois agents chélateurs à haute affinité pour le fer, appelés sidérophores. Durant sa vie intracellulaire, *Legionella* peut ainsi acquérir du fer à partir de la ferritine (protéine plasmique responsable de la régulation des concentrations du fer dans l'organisme) et de l'hème (associé aux sous unité de l'hémoglobine).

D'autres métaux peuvent favoriser ou à l'inverse inhiber la croissance de *L. pneumophila* : par exemple des concentrations de 10 à 100 µg/L des ions fer ou du zinc stimulent la multiplication

de *L. pneumophila*, au delà de 100 µg/L l'effet est inversé. Pour le potassium, l'effet stimulateur est observé jusqu'à 100 mg /L (Reeves *et al.*, 1981 ; States *et al.*, 1985).

La sensibilité des légionelles au NaCl a été constatée depuis longtemps, elles peuvent cependant survivre dans des solutions contenant 30 g/l de NaCl lorsque la température est comprise entre 4 et 20°C. L'association d'une température plus élevée (30-37°C) et d'une concentration de 15 g/l de NaCl réduisent fortement leur nombre dans les cultures (Heller *et al.*, 1998). Néanmoins, à notre connaissance, aucune publication ne rapporte la capacité de multiplication des légionelles dans l'eau de mer.

Si l'on dénombre une cinquantaine d'espèces de légionelles, *Legionella pneumophila* du séro groupe 1 (*Lp1*) est responsable de 95% des cas cliniques de légionellose en Europe (Gomez-Valero *et al.*, 2009). La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire en France depuis 1987 (DO), déclaration qui s'effectue en deux temps : (1) dès que le diagnostic est établi, déclaration par les cliniciens ou les biologistes à la DDASS (Direction départementale des affaires sanitaires et sociales) et à l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) ce qui permet d'identifier des lieux d'exposition à risques ; (2), notification par l'envoi d'une fiche anonyme de chaque patient présentant une légionellose. L'InVS dénombre environ 1500 cas de légionellose en France chaque année (1540 en 2010 et 1170 cas en 2011).

II.3 *Legionella* et légionellose

II.3.1 Historique

La maladie de Légionnaire a été décrite pour la première fois en juillet 1976 : 182 vétérans de la légion américaine participant à la 56^{ème} convention de « *l'American Legion* » ont contracté dans un hôtel de Philadelphie une pneumonie sévère provoquant 29 décès (Fraser *et al.*, 1977). La bactérie, à l'origine de cette épidémie, a été isolée seulement en janvier 1977 par le Dr J. McDade en utilisant des œufs embryonnés et des échantillons de tissus pulmonaires de patients et a été appelée *Legionella pneumophila* (McDade *et al.*, 1979). Mais c'est ensuite C. Fliermans qui trouva l'origine aquatique de *L. pneumophila* et l'isola à nouveau à partir de sources chaudes du bassin de Yellowstone aux U.S.A. et dans l'eau chaude produite par les réacteurs d'une centrale nucléaire.

La légionellose résulte de l'inhalation d'aérosols ou de microgouttelettes d'eau contaminées par des légionelles. Aucune transmission de personne à personne n'a été reportée à ce jour (Fraser *et al.*, 1977 ; Stout *et al.*, 1997 ; Greub, 2004). La légionellose est une pneumonie atypique qui peut prendre trois formes.

II.3.2 Taxonomie

Depuis l'émergence de la maladie des légionnaires, la caractérisation des souches isolées de patients a abouti à la création d'un nouveau genre bactérien appartenant à la famille des *Legionellaceae* (Brenner *et al.*, 1979). L'analyse de l'ARN ribosomal 16S de toutes les légionelles étudiées a révélé plus de 95% d'identité de séquence et a permis par conséquent de conforter l'appartenance de ces souches à un seul genre (*Legionella*) qui correspond à la famille des *Legionellaceae* (Fry *et al.*, 1991).

II.3.2.1 Morphologie de la bactérie

Les légionelles se présentent sous forme de bacilles aérobies à Gram négatif (faiblement colorés) non sporulés et non capsulés, de forme coccobacillaire de 0,3 à 0,9 µm de large sur 2 µm de longueur, pouvant prendre des formes allongées et filamenteuses en culture (plus de 20 µm de long, figure 10). Ces bactéries, d'origine hydrique, sont généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires ou subpolaires.

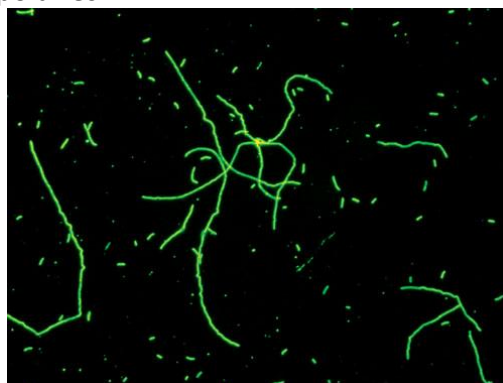


Figure 10 Forme bâtonnet et forme filamenteuse de *L. pneumophila* marquées par immunofluorescence.

II.3.2.2 Caractères phénotypiques et biochimiques

Les légionelles sont des bactéries chimio-organotrophes et utilisent les acides aminés comme source d'énergie et de carbone (Benson *et al.*, 1998). Elles sont auxotrophes vis-à-vis de la L-cystéine et sont exigeantes en sels de fer lors du primo-isolément sur des milieux gélosés solides. Elles n'hydrolysent pas les sucres (ni par fermentation, ni par oxydation), ne réduisent pas les nitrates et ne synthétisent pas d'uréase. Ces bactéries possèdent deux catalases (*KatA* et *KatB*), hydrolysent l'hippurate et la gélatine. Ces deux derniers caractères sont variables selon les espèces et parfois selon les souches d'une même espèce. La plupart des espèces produisent une β -lactamase et les réactions d'oxydase sont variables selon les espèces. Enfin, ces bactéries synthétisent plus d'acides gras ramifiés que d'acides gras non ramifiés.

Elles présentent jusqu'à 90% d'acides gras insaturés dans la paroi (caractère inhabituel pour une bactérie Gram-Négative). Les quinones isopréniques de la membrane cytoplasmique jouent un rôle important dans le transport des électrons et les mécanismes de phosphorylation oxydative ; le nombre des unités isopréniques de la chaîne latérale constitue un marqueur taxonomique bactérien. Chez *Legionella*, le nombre d'unités isopréniques est de 9 à 14, au lieu de 6 à 10 en général chez les bactéries à Gram-Négatif.

Certaines espèces se distinguent par la capacité d'auto-fluorescence bleue (*L. anisa*, *L. dumoffii*...) ou jaune vert (*L. longbeachae*, *L. micdadei*...) des colonies exposées à des longueurs d'onde élevées (360 nm) (Jarraud et Freney, 2006).

II.3.2.3 Conditions et milieux de culture

Les légionelles sont des bactéries thermophiles avec un optimum compris entre 20 et 42°C, bien que certaines souches aient été isolées dans des eaux de 6 jusqu'à 66°C.

Le pH optimal de croissance est légèrement acide (de l'ordre de 6,8-6,9) et, pour la majorité des espèces, la culture se fait à une température optimale de 36°C +/- 1°C pendant 3 à 10 jours. Les cultures sont généralement réalisées sur gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) supplémentée en L-cystéine, en tampon ACES et en fer (Feeley *et al.*, 1979). La source de fer peut

être constituée par du nitrate de fer, du sulfate de fer, du chlorure de fer, de l'hématine ou de l'hémine mais, les meilleurs résultats sont obtenus avec du pyrophosphate de fer. Le milieu GVPC obtenu par l'incorporation de la glycine, la vancomycine et de la polymyxine B est également utilisé comme milieu de culture sélectif puisque il permet une meilleure inhibition des flores annexes.

Sur ces milieux de culture gélosés (BCYE), les colonies de légionelles sont grisâtres, de consistance muqueuse, de taille hétérogène et présentent généralement un aspect en « verre fritté » sous la loupe binoculaire.

II.3.2.4 Phylogénie du genre *Legionella*

Bien que la séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S soit souvent utilisée comme un marqueur pour les analyses phylogénétiques des bactéries, sa discrimination n'est correcte qu'au niveau du genre *Legionella*, mais il ne permet pas de différencier les différentes espèces de ce genre (Gomez-Valero *et al.*, 2009). Par contre, plusieurs autres marqueurs se sont révélés discriminants au niveau des espèces et parfois même des sérogroupes. Il s'agit :

- de la région hypervariable d'ADN intergénique ribosomal 23S-5S (Grattard *et al.*, 2006) qui a permis, dans un premier temps, une différenciation entre les espèces de légionelles ;
- du gène *mip* (« macrophage infectivity potentiator » dont la séquence a été déterminée chez un grand nombre d'espèces de légionelles ce qui constitue la « *Legionella mip* gene sequence database (Ratcliff *et al.*, 1998) ;
- du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de la RNA polymérase (Ko *et al.*, 2002) qui a permis de différencier les espèces *fraseri* et *pneumophila*, ce qui n'était pas possible avec les marqueurs 16S RNA et *mip* ;
- du gène *rnpB* codant pour la RNase P, endoribonuclease qui dégrade le segment 5' du précurseur des ARNt (Rubin *et al.*, 2005).

Néanmoins, l'arbre phylogénétique reposant sur le gène *rpoB* s'est avéré très différent de ceux construits sur la base des séquences *mip* ou ARN 16S. Une nouvelle approche consiste à utiliser trois marqueurs au lieu d'un seul ; ainsi Rubin *et al.* (2005) ont analysé une combinaison des séquences des gènes *mip*, *rnpB* et ARN 16S de 55 souches cultivables de légionelles ce qui a grandement amélioré l'identification des souches de légionelles (figure 11).

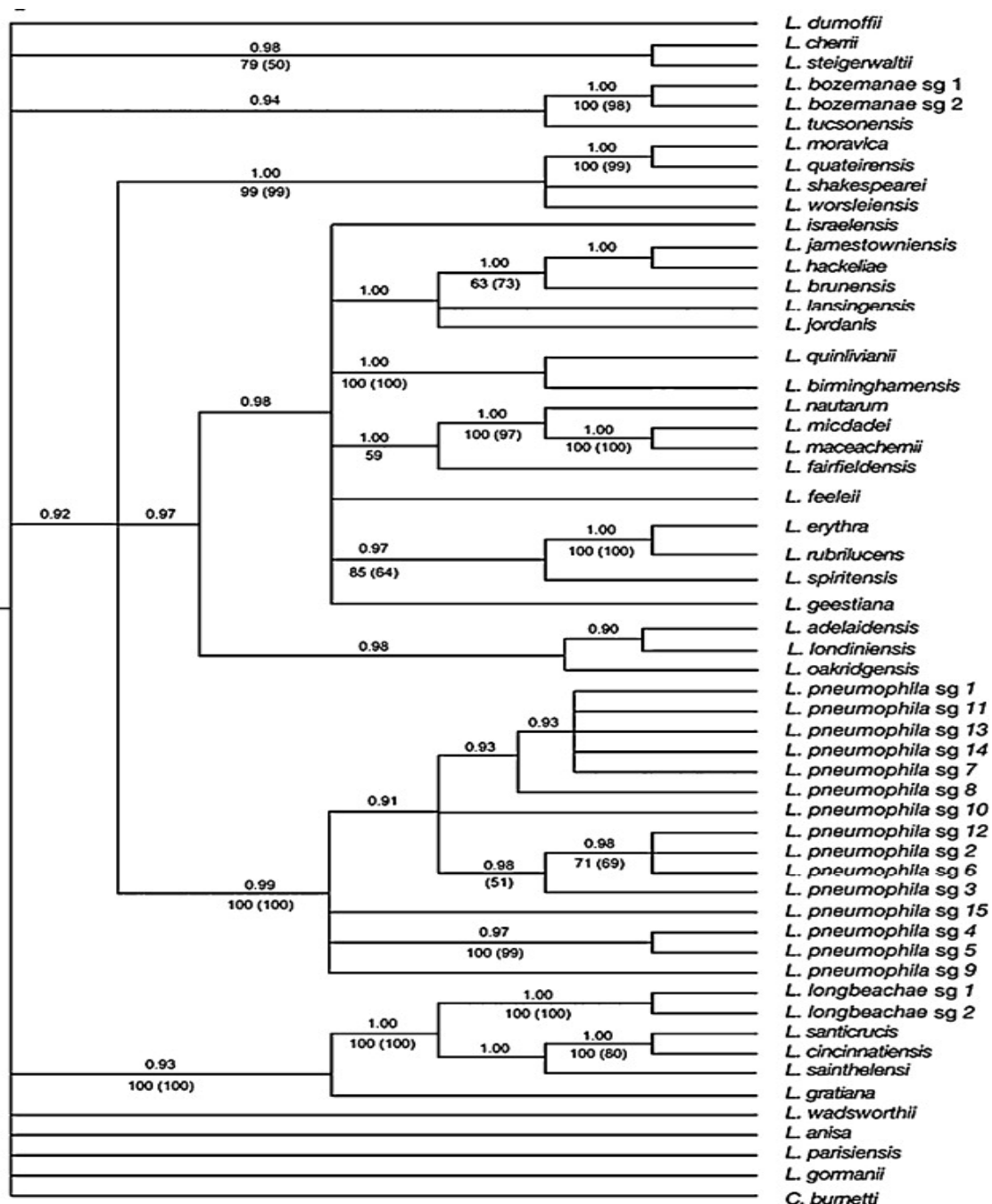


Figure 11 : Arbre phylogénétique résultant d’une analyse de Bayes combinant les données de trois types de séquences (*rnpB*, *mip* et ARN 16S) de 55 souches du genre *Legionella* (Ratcliff *et al.*, 1998)

II.3.2.5 Diversité et originalités des génomes de *L. pneumophila* séro groupe 1

A ce jour, cinq génomes complets de différents isolats cliniques de Lp1 ont été séquencés et publiés. Les séquences sont accessibles sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) ou sur le site Legiolist de l’institut Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>) :

- **Lp1 Philadelphia** est responsable de la première épidémie répertoriée de 182 cas de légionellose en 1976 à Philadelphia (USA) et causant 29 décès (MCDade *et al.*, 1979) ;

- **Lp1 Paris** est une souche endémique qui a colonisé le réseau d'eau de la région parisienne depuis 1987 et est responsable de 30% des cas de légionellose dans cette région. En 2003, la souche Paris était responsable de 12,2% des cas de légionellose en France et, depuis 2008, elle est impliquée dans des épidémies et des cas sporadiques distribués dans le monde entier (Cazalet *et al.*, 2008) ;
- **Lp1 Lens** a causé la plus forte épidémie de légionellose en France sur 10 communes de la région de Lens pendant l'hiver 2003-2004 : 86 cas, 17 décès. La mise en œuvre, dès l'alerte de l'épidémie, d'enquêtes coordonnées en microbiologie, épidémiologie et des sites à risques a conduit à identifier les deux tours aéro-réfrigérantes (TARs) contaminées d'un site de pétrochimie. Ces TARs ont libéré des aérosols contaminés, créant une zone de contamination dans un rayon de 10 km (Nguyen *et al.*, 2006) ;
- **Lp1 Corby** est une souche virulente isolée d'un patient atteint de légionellose suite à une épidémie de 25 cas à Corby (Angleterre) entre 1996 et 1998 (Jepras *et al.*, 1985) ;
- **Lp1 Alcoy** 2300/99 a été isolée à partir d'un patient atteint de légionellose suite à plusieurs épidémies successives dans la ville espagnole d'Alcoy en 1999 et 2000 et impliquant des TARs. Ce fut la plus forte épidémie répertoriée avec 357 cas. Depuis, cette souche particulièrement résistante a été impliquée dans d'autres épidémies récurrentes (Fernandez *et al.*, 2002).

Tableau 2 : Principales caractéristiques des cinq génomes séquencés de cinq *L. pneumophila* (D'Auria *et al.*, 2010)

	<i>Philadelphia</i>	<i>Paris</i>	<i>Lens</i>	<i>Corby</i>	<i>Alcoy</i>
Taille chromosome (Kb)	3 397	3 503	3 345	3 576	3 516
Taille plasmide (kb)	-	131	59	-	-
Pourcentage CG (% GC plasmide)	38,3	38,3 (37,4)	38,4 (38,4)	38,5	38,4
Nombre de gènes (gènes plasmidiques)	3 003	3136 (142)	3001 (57)	3257	3243
Gènes codant pour des protéines (gènes plasmidiques)	2 943	3027 (139)	2878 (56)	3204	3190
% gènes codant pour des protéines (% gènes plasmidiques)	88%	87 (92)	86 (84)	86	87
Accès NCBI	NC_002942	NC_006368	NC_006369	NC_009494	CP001828

Les 5 génomes analysés ont une taille très proche de 3,3 à 3,5 Mb et partagent le même pourcentage CG moyen (38%) (tableau 2). Il est à noter que les génomes des souches Lens et Philadelphia ont une taille légèrement inférieure aux 3 autres souches, mais ce qui ne diminue pas significativement le pourcentage de gènes codant pour des protéines. Seules les souches Paris et Lens abritent un plasmide.

Legionella longbeachae NSW150, qui est responsable de 50% des cas de légionellose dans le sud de l'Australie, et qui est principalement présente dans le sol et le compost, présente un génome de 4077 kb ce qui est supérieur à ceux des Lp1 étudiées (Cazalet *et al.*, 2010) ; par contre le pourcentage GC est légèrement inférieur à celui des autres souches : 37 contre 38%. Deux autres différences physiologiques majeures sont à signaler : l'absence de flagelle et la présence d'une capsule chez *L. longbeachae*.

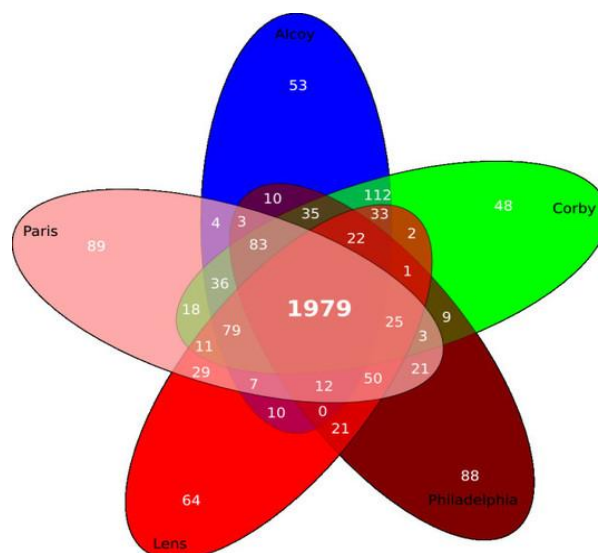


Figure 12 : Diagramme montrant le cœur du génome et les gènes spécifiques aux souches Paris, Lens, Philadelphia, Corby et Alcoy.

La comparaison de ces 5 génomes de *Lp1* met en évidence le fait que les 5 souches sont très proches sur le plan phylogénétique et partagent un cœur de génome de 1979 gènes, correspondant à 66,8 % du pangénome (figure 12) (D’Auria *et al.*, 2010). Mais, il existe une forte diversité génétique concernant 33% des gènes. Cette diversité s’explique par la présence de nombreuses séquences IS, de gènes codant pour des transposases ou des intégrases, des séquences palindromiques répétées (CRISPR : « clustered regularly interspaced short palindromic repeats ») codant pour des systèmes de résistance aux phages (Alcoy, Lens et Paris) et des îlots phagiques contenant plusieurs gènes codant pour des protéines phagiques (transposases de la famille IS4). Ces données suggèrent des échanges génétiques, tels que des transferts horizontaux de gènes et l’acquisition d’îlots de pathogénicité, mais aussi de 13 îlots génomiques auxquels il n’a pas été encore possible d’associer une fonction.

Comme d’autres bactéries intracellulaires telles que *Coxiella burnetii*, *Wolbachia pipitensis* ou *Rickettsia felis* et *Rickettsia bellis*, les génomes des 5 *Lp1* étudiées portent des gènes codant pour des protéines à motifs eucaryotes (Gomez-Valero *et al.*, 2009). Cependant, *L. pneumophila* est le procaryote codant pour la plus grande variété de motifs de protéines eucaryotes (Albert-Weissenberg *et al.*, 2007) :

- protéines à motif F-box ou U-box qui sont spécifiques des *Lp1*, car non retrouvées chez d’autres bactéries intracellulaires ; ces protéines peuvent attacher l’ubiquitine, un peptide de 76 acides aminés, à des protéines qui seront ensuite dégradées par le protéasome eucaryote ; les protéines de *Legionella* avec des motifs F-box ou U-box, si elles sont sécrétées dans l’hôte, pourraient ainsi digérer les protéines de l’hôte vers le protéasome ;
- Sérine-thréonine kinases (STK) à motif eucaryote (motifs de Hanks) qui sont connues pour être essentielles à la virulence d’autres pathogènes ; c’est le cas de *YpkA* de *Yersinia pseudotuberculosis* et de *PknG* de *Mycobacterium tuberculosis* qui sont sécrétées chez l’hôte eucaryote. Récemment, il a été identifié 5 STK (*LegK1*, *LegK2*, *LegK3*, *LegK4*, *LegK5*) chez *Lp1* Lens (Hervet *et al.*, 2011) . Une approche génétique a mis en évidence le fait que *LegK2* est essentielle à la virulence de *L. pneumophila* (Hervet *et al.*, 2011) ;

- Un grand nombre de gènes de *Lp1* codent pour des protéines à motifs ankyrine (de 13 à 20 gènes selon les souches). Ces protéines multifonctionnelles sont très nombreuses chez les eucaryotes et impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que l'interaction avec le cytosquelette. AnkH et AnkY de *Lp1* Philadelphia par exemple jouent un rôle dans la multiplication des cellules bactériennes dans l'hôte. Il est intéressant de souligner qu'une protéine ankyrine de la souche Philadelphia présente une homologie avec celle du mimivirus qui infecte l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* et est aussi capable de se multiplier dans les macrophages (Lurie-Weinberger *et al.*, 2010) ;
- La sphingomyéline est un phospholipide des membranes des eucaryotes ; or, le génome des *Lp1* porte des gènes impliqués dans le catabolisme de la sphingomyéline : gènes codant pour une sphingomyélinase, une sphingosinekinase et une sphingosine-1-phosphate lyase (Spl). La Sp1 est connue pour contrôler de nombreuses fonctions cellulaires telle que la survie cellulaire, l'apoptose, ainsi que la distribution de l'actine chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*. On peut donc spéculer sur le contrôle des *Lp1* dans la survie de leur hôte ;
- Les génomes de *Lp1* portent aussi un gène codant pour une métalloprotéase à zinc de type eucaryote qui pourrait être impliquée, comme cela a été montré pour ZmpC (métalloprotéinase à zinc) du pneumocoque, dans le clivage de la métalloprotéinase 9 de la matrice extracellulaire humaine (MMP-9). Le pneumocoque comme *Lp1* causant des pneumonies, ces métalloprotéinases joueraient un rôle dans l'infection des poumons.

La présence de ces nombreuses protéines de type eucaryote pourrait être le résultat de la co-évolution de *L. pneumophila* dans des protistes.

II.3.3 Affections de l'homme liées aux légionelles

II.3.3.1 Différentes Formes de la maladie

II.3.3.1.1 La maladie du Légionnaire (légionellose)

C'est la forme la plus grave de cette maladie, qui survient principalement chez les personnes à risques (personnes âgées, immunodéprimées, fumeurs, ...) (Hilbi *et al.*, 2010). Cette maladie est caractérisée par une infection pulmonaire aiguë. La période d'incubation est de 2 à 10 jours et elle débute par un syndrome pseudo-grippal. Les principaux symptômes qui surviennent ultérieurement sont : fièvre élevée, essoufflement, toux importante, une pleurésie et la formation d'abcès pulmonaires.

Heureusement, l'antibiothérapie est efficace chez l'homme grâce à un traitement classique avec un macrolide (azithromycine). Pour les cas sévères, ce macrolide peut être associé à une fluoroquinolone et/ou de la rifampicine. La létalité globale est estimée à 11%, mais peut-être très supérieure chez des patients à risques. Néanmoins, certaines personnes, exposées à cette bactérie, ne développent pas de symptômes et restent résistantes (Ruiz *et al.*, 1999 ; Gupta *et al.*, 2001).

II.3.3.1.2 La fièvre de Pontiac

Il s'agit d'une forme bénigne de la maladie qui se traduit par un syndrome grippal sans pneumonie, guérissant spontanément en 2 à 5 jours. 95% des personnes contaminées par la bactérie développent ce syndrome (Glick *et al.*, 1978).

II.3.3.1.3 Les légionelloses extra-pulmonaires

En l'absence de traitement antibiotique, *L. pneumophila* est capable de migrer hors des poumons et d'infecter d'autres organes principalement le cœur (myocardite, péricardite, endocardite), l'appareil digestif (péritonite, colite nécrosante, pancréatite), l'appareil musculaire, le système nerveux (sommolence).

II.3.3.2 Prévalence et facteurs de risques

L'incidence de la légionellose dans le monde reste inconnue, en effet les méthodes d'identification et de diagnostic diffèrent énormément d'un pays à un autre. L'incidence dépend également de l'intensité et de la pertinence des enquêtes épidémiologiques. En France, cette maladie est soumise à une déclaration obligatoire instaurée depuis 1987. Le Centre National de Référence des Légionelles (CNRL), situé à Lyon, assure une activité d'expertise, d'identification et de typage des légionelles à partir de prélèvements pulmonaires, sériques et urinaires, ce qui participe à la validation du diagnostic.

Depuis 1997, le renforcement de la surveillance de la légionellose et la sensibilisation des professionnels de la santé, a abouti à la détection d'une augmentation du nombre de cas de légionellose déclarés auprès des autorités sanitaires et à l'InVS (Institut de Veille Sanitaire). Il s'élève à 1540 cas pour l'année 2010 avec une incidence de 2,38 pour 100 000 habitants (données InVS, 2011). Depuis 1998, plus de 10 épisodes de cas groupés de légionellose ayant concerné au minimum 8 personnes ont été enregistrés. Les rapports de la plupart de ces cas sont disponibles sur le site de l'InVS (<http://www.invs.sante.fr/surveillance/legionellose/publications.htm>).

Les investigations épidémiologiques et environnementales réalisées suite à ces cas groupés ont mis en cause la contamination de tours aéro-réfrigérantes (TARs) par des légionelles (Paris 1998, Lens 2003-2004, Paris 2006, Nice 2007...). Aussi, les DRIRE (Directions régionales de l'industrie, de la recherche et de l'environnement) ont été sollicitées pour répertorier les TARs dans tous les départements et l'arrêté ministériel paru au JO du 31 décembre 2004 a exigé l'analyse mensuelle des légionelles dans ces installations.

Les autres sources de contaminations incriminées dans les épidémies sont les circuits de distribution d'eau chaude sanitaire (douches), les systèmes de climatisation, les eaux thermales chaudes. Ces installations constituent en effet des habitats favorables où les légionelles se multiplient préférentiellement à des températures comprises entre 25 et 42°C (O'Neill et Humphrey, 2005).

Selon le conseil Supérieur d'Hygiène Public de France, on distingue deux catégories de personnes à risque :

Les « Personnes à haut risque » : les immunodéprimés sévères, notamment suite à une transplantation ou greffe d'organe, ou suite à une corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de Prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est à dire supérieure à 5 mg/kg de Prednisone pendant plus de 5 jours).

Les « personnes à risque » : les personnes ayant un système immunitaire fortement diminué du fait d'une pathologie (hémopathie maligne, leucémie, cancers surtout broncho-pulmonaires) ou d'un traitement immunodépresseur. D'autres facteurs de risque ont été rapportés :

- Age élevé ; l'incidence augmente avec l'âge : la maladie du légionnaire est rare chez les personnes de moins de 20 ans. De très rares cas de légionellose ont été rapportés en pédiatrie chez les enfants immunodéprimés ;
- Le sexe masculin (3 malades sur 4 sont des hommes) ;
- La consommation du tabac (entre 1997 et 1999, 32 à 41 % des malades sont des fumeurs) ;
- La présence de pathologies sous-jacentes : diabète, pathologie chronique cardiaque, pulmonaires ou l'insuffisance rénale, ou les antécédents d'une intervention chirurgicale récente.

Un certain nombre de cas s'observent néanmoins chez des sujets n'ayant pas de facteurs de risque rapportés.

Enfin, le nombre de légionelles seul ne peut pas être utilisé pour prédire si une source positive de la bactérie va provoquer une infection. La probabilité qu'une source provoque une épidémie dépend de plusieurs facteurs : la charge de bactéries, l'efficacité de la diffusion, la manière dont les bactéries se multiplient et la capacité de la source à former des aérosols.

II.3.3.3 Les espèces et les sérogroupes associés à la légionellose

Le genre *Legionella* est caractérisé par 56 espèces à ce jour, mais l'espèce *pneumophila* représente 75,5% des légionelles environnementales et 95% des cas de légionellose en France (Doléans *et al.* 2004). L'espèce *pneumophila* comprend une quinzaine de sérogroupes qui ont été distingués sur la base de différences de l'antigène O porté par les lipopolysaccharides des enveloppes superficielles des bactéries (Jarraud et Freney, 2006). En 2010, *L. pneumophila* sg 1 a été responsable de 98% des cas de légionellose en France (source InVS).

D'autres sérogroupes (sg) ont également été incriminés dans des cas de légionellose, parmi lesquels le sg 3 et le sg 6 principalement. Parmi les 56 espèces de *Legionella*, seul un tiers des espèces a été associé à des cas de légionelloses, parmi lesquelles : *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. gormanii* (Reingold *et al.*, 1984 ; Fang Yu et Vickers, 1989). Au niveau mondial, de nombreuses études montrent que *Lp1* est le principal agent de la légionellose (80% des cas). L'Australie et la Nouvelle-Zélande sont des exceptions : 50% des légionelloses sont dues à *L. longbeachae* souvent contractées après une exposition à des composts contaminés (Steele *et al.*, 1990).

L'implication des espèces autres que *L. pneumophila* n'est pas toujours facile à mettre en évidence en raison d'un manque de tests de diagnostics spécifiques et fiables (Fields *et al.*, 2002). Certaines légionelles ne sont pas cultivables sur des milieux de culture de laboratoire utilisés pour *L. pneumophila*. Elles sont nommées LLAPs (« *Legionella*-like amoebal pathogens »). Ces LLAPs sont isolées et cultivées par co-culture avec des amibes puisqu'elles sont capables d'infecter et de lysier ces amibes. Les travaux d'Adeleke *et al.* (2001) ont permis de classifier 4 souches LLAPs en 3

espèces nouvelles de *Legionella*: *Legionella drozanskii*, *Legionella fallonii* et *Legionella rowbothamii*. Trois autres souches LLAPs se sont avérés être des membres de l'espèce *Legionella Lytica*.

II.3.4 Virulence

L. pneumophila est une bactérie intracellulaire facultative capable de se multiplier dans les cellules eucaryotes phagocytaires (protozoaires dont les amibes, macrophages pulmonaires) La virulence et l'écologie des légionelles sont intrinsèquement liées. En effet, les amibes sont présentes dans les mêmes écosystèmes que les légionelles, tels que les lacs, les rivières, les sources d'eau chaude mais aussi les systèmes anthropisés tels que les réseaux d'eau, les circuits de refroidissement d'eau, les TARs, et les spas...

C'est Rowbotham qui a démontré pour la première fois la capacité de *L. pneumophila* à infecter les amibes (Rowbotham, 1980). Il a par la suite caractérisé le cycle de multiplication des légionelles dans les amibes (Rowbotham, 1986). *L. pneumophila* est capable d'infecter plusieurs types d'amibes (*Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella sp.*, ou *Naegleria sp.*). Récemment, il a même été démontré que *L. pneumophila* est aussi capable de survivre dans le système intestinal du nématode *C. elegans*, qui conduit à la mort de ce métazoaire (Brassinga *et al.*, 2010) et dans le protozoaire cilié *Tetrahymena* (Berk *et al.*, 1998 ; Steele *et al.*, 1996).

La similitude du processus infectieux de *L. pneumophila* dans les protozoaires et les macrophages humains est frappante et repose sur un mécanisme d'échappement de la fusion du phagosome abritant les légionelles et du lysosome (Garduno *et al.*, 2002 ; Horwitz, 1983) (figure 13). L'infection des cellules phagocytaires par les légionelles s'effectue en plusieurs étapes :

1. entrée des légionelles par un mécanisme de « coiling » des cellules phagocytaires (amibes, macrophages) ;
2. échappement dès les premières minutes à la voie classique de la phagocytose: il n'y a donc pas de fusion du phagosome contenant la légionelle avec le lysosome ; cette vacuole de phagocytose ne porte déjà plus les marqueurs classiques eucaryotiques (GTPases Rab5 et Rab7, et Lamp-1) qui permettent les interactions avec les endosomes tardifs ;
3. recrutement à la surface de la vacuole contenant la légionelle de vésicules dérivées du réticulum endoplasmique, de mitochondries et de ribosomes ;
4. multiplication active des légionelles dans cette vacuole spécialisée ; lors de cette phase « **répllicative** », les cellules bactériennes ne sont pas flagellées et sont beaucoup plus sensibles aux stress et aux drogues ;
5. la carence en nutriments induit à nouveau l'expression de gènes de virulence et de ceux responsables de la synthèse du flagelle bactérien ; durant cette phase dite « **transmissive** », les légionelles sont très virulentes, plus résistantes aux stress et aux drogues (biocides, antibiotiques) (Barker *et al.*, 1992 ; 1995) ;
6. ces légionelles virulentes lysent la vacuole, puis la membrane de l'amibe et se disséminent dans le milieu extracellulaire, prêtes à infecter un nouvel hôte.

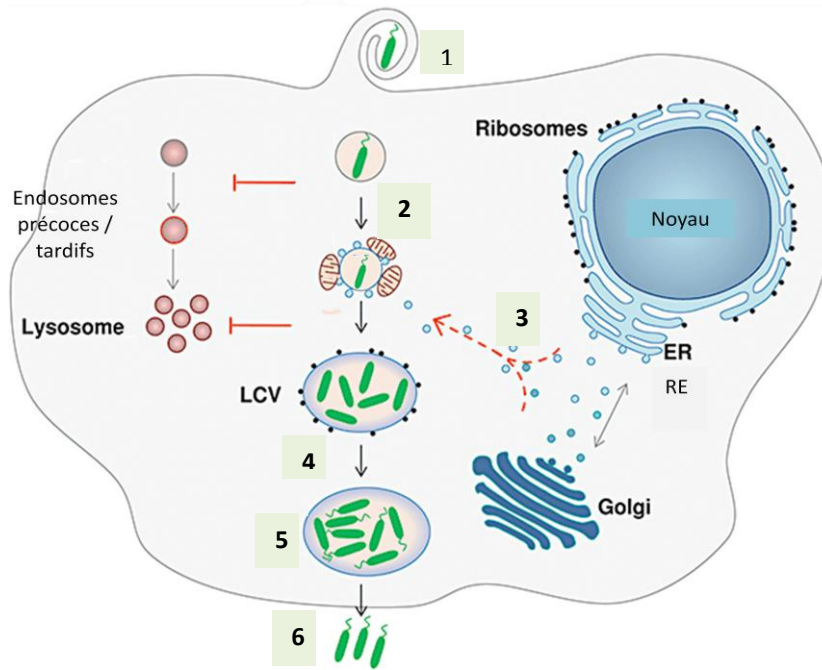


Figure 13 : Cycle de *Legionella pneumophila* dans une cellule eucaryote (d'après de Felipe *et al.*, 2008).

Selon l'hôte phagocytaire, amibe ou macrophage, il existe tout de même certaines différences qui concernent deux étapes du cycle infectieux : la phagocytose et la libération des légionelles. La phagocytose est apparemment « récepteur - dépendante » chez les amibes alors qu'elle est « actine dépendante » chez les macrophages (Fields *et al.*, 2002). La libération des bactéries après l'infection d'une amibe s'opère par lyse (nécrose) cellulaire et formation de pores membranaires, mais jamais par apoptose (Gao *et al.*, 2000). Lors de l'infection du macrophage, ce processus s'opère par apoptose et formation de pores membranaires (figure 14 et 15).

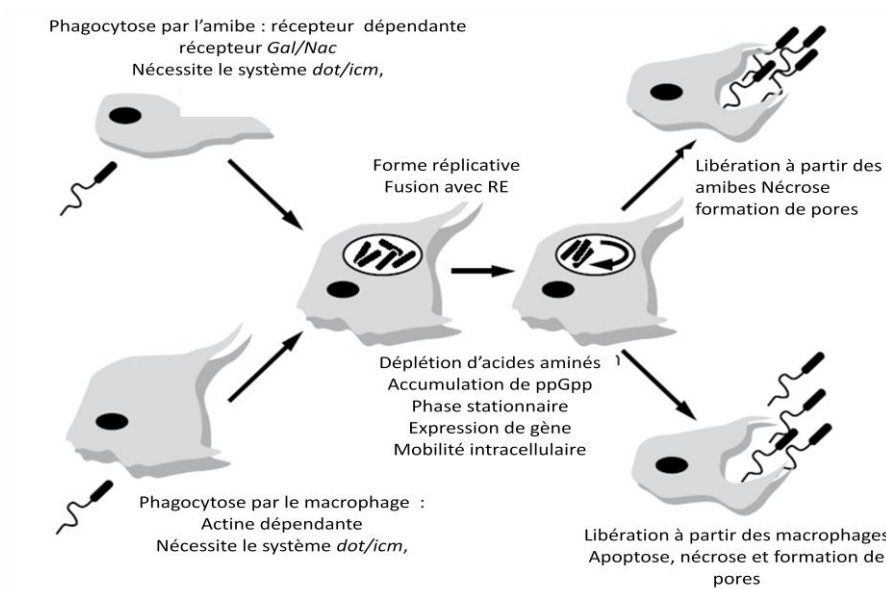


Figure 14 : Cycle cellulaire de *L. pneumophila* dans les amibes et les macrophages humains (d'après Fields *et al.*, 2002)

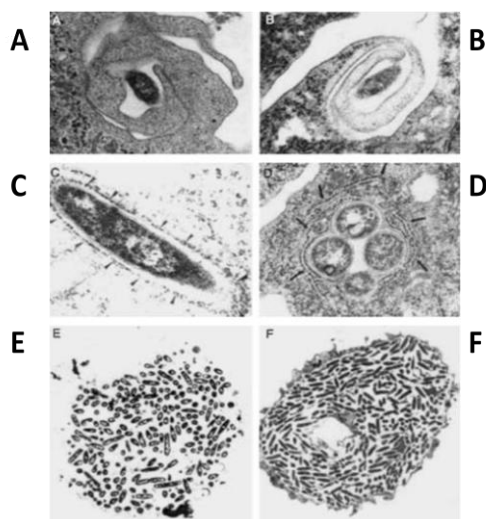


Figure 15 : Infection d'*Acanthamoeba polyphaga* (B, D, F) et le macrophage U937 (A, C, E) par *L. pneumophila*. Phagocytose (A et B) ; formation du réticulum endoplasmique (RER) entourant le phagosome (C et D) ; dernier stage de l'infection (E et F). Photos prise à l'aide de microscope électronique (Bitar *et al.*, 2004).

Il est aussi intéressant de souligner que Berk *et al.* (1998) ont montré que les légionelles peuvent aussi être externalisées dans des vésicules produites par des amibes et par le cilié *Tetrahymena*. Ce processus ressemble à celui opéré par les amibes qui se débarrassent des vésicules nutritives lors de leur transformation en kystes. Ces vésicules confèrent aux légionelles une protection, par conséquent une meilleure résistance, vis-à-vis de l'environnement et constituent un complexe infectieux dangereux.

La multiplication intracellulaire des légionelles induit des changements physiologiques de ces bactéries, telle que la modification du profil des acides gras, et éventuellement des LPS (Barker *et al.*, 1993). Mais, la multiplication intracellulaire confère aussi aux bactéries :

- Une résistance accrue aux produits chimiques (biocides) (Barker *et al.*, 1992) et aux antibiotiques (Barker *et al.*, 1995) ;
- Une amplification du pouvoir infectieux bactérien vis-à-vis des macrophages humains et des amibes (Cirillo *et al.*, 1994 ; 1999).

II.3.4.1 Facteurs de virulence et structures de la surface bactérienne

Certaines structures de surface jouent un rôle important dans le processus infectieux de *Legionella* (Cianciotto, 2001 ; Heuner *et al.*, 2002). L'adhésion et la phagocytose de la bactérie par la cellule hôte constituent deux étapes indispensables dans le cycle infectieux. L'adhésion est assurée par l'intermédiaire des flagelles, des pilis de type IV mais aussi d'autres protéines de surface telles que les protéines MOMP, Hsp60, et Mip ainsi que des lipopolysaccharide (LPS) :

- **La protéine MOMP** (Major Outer Membran Protein), codée par le gène *ompS*, est une porine associée au peptidoglycane, capable de s'insérer dans les membranes des cellules hôtes et d'ouvrir des canaux qui vont permettre le passage d'ions (Dowling *et al.*, 1992 ; Gabay *et al.*, 1985). Cette protéine se lie également aux récepteurs du complément CR1 et CR3 qui se trouvent à la surface des monocytes humains, favorisant l'attachement de la bactérie à la cellule hôte (Steinert *et al.*, 2002) ;

- **La protéine Hsp60** : La biosynthèse de cette protéine (« Heat shock protein », 60Kda) est induite pendant la croissance dans les macrophages et, *in vitro*, en réponse au peroxyde

d'hydrogène, à la chaleur et au choc osmotique. Hsp60 serait également impliquée dans l'attachement et l'entrée de *Legionella* dans les cellules épithéliales HeLa (Garduno *et al.*, 1998) ;

- **La protéine Mip** (« Macrophage infectivity potentiator », 24 kDa) est codée par le gène *mip* et exprimée à la surface des *L. pneumophila*. C'est une protéine nécessaire aux premières étapes d'infection des cellules hôtes (Cianciotto, 2001) mais son rôle exact reste toujours inconnu. Cette protéine possède une activité peptidyl-prolyl cis/ trans isomérase (PPIase) (Steinert *et al.*, 2002) ;

- **Les Lipopolysaccharides** (LPS) qui recouvrent la surface des légionelles jouent un rôle important dans l'adhésion de *Legionella* à la muqueuse respiratoire (Steinert *et al.*, 2002). Les LPS sont les déterminants immunogéniques les plus importants qui confèrent la spécificité du sérotype. Les LPS possèdent une chaîne homopolysaccharide spécifique (Antigène O) d'un dérivé 5-N-acétimidoylé et 7-N-acétylé de l'acide légionaminique. Le caractère très hydrophobe des LPS renforcerait la virulence des légionelles ;

- **Les pili de type IV** (0,8 à 1,5 µm) synthétisés par *L. pneumophila* interviennent dans un mécanisme d'attachement à la cellule hôte (Donlan *et al.*, 2002 ; Soderberg *et al.*, 2004). L'étude d'un mutant déficient pour la synthèse de ces pilis de type IV montre que l'adhérence aux cellules épithéliales HeLa, aux macrophages U937 et à *Acanthamoeba polyphaga* est diminuée de 50%. La biosynthèse de ces pilis semble contrôlée par la température car la « piliation » des légionelles est beaucoup plus importante à 30°C qu'à 37°C. Il est aussi important de souligner que ces pilis sont également associés au transfert d'ADN dans le cadre des mécanismes de compétence naturelle observés chez *L. pneumophila* *sg 1* Philadelphia (Stone et Kwaik, 1999) ;

- **les Flagelles** : L'existence des flagelles est associée à la phase transmissive infectieuse de *Legionella* comme d'autres facteurs de virulence. La biosynthèse des flagelles dépend aussi de la température : augmentation lorsque la bactérie est cultivée à 30°C plutôt qu'à 37°C ou 41°C. L'expression des flagelles est sous le contrôle d'une cascade de régulation complexe qui implique plusieurs facteurs transcriptionnels : sigma54, sigma28, sigmaS et CsrA (« carbon Storage Regulation ») (Jacobi *et al.*, 2004) Les flagelles n'interviennent pas dans le phénomène d'adhésion, mais plutôt au moment de la pénétration des légionelles dans la cellule hôte (Dietrich *et al.*, 2001). Néanmoins, l'absence de flagelle (par exemple, chez un mutant déficient pour la protéine FlaA) n'affecte pas significativement la virulence de *L. pneumophila* au niveau de la multiplication intracellulaire dans l'hôte (Merriam *et al.*, 1997). Les flagelles confèrent une mobilité aux légionelles, augmentant ainsi les probabilités de rencontre avec les amibes et la capacité d'invasion de la bactérie (Vogel *et al.*, 1999).

II.3.4.2 Les systèmes de sécrétion de *L. pneumophila* et les facteurs de virulence 'transloqués' dans la cellule hôte

L. pneumophila et *Coxiella burnetti* sont les deux seules bactéries utilisant un système de sécrétion de type IVB pour les mécanismes de virulence. L'aptitude à la vie intracellulaire de *Legionella* repose principalement sur un système de sécrétion appelé Dot/Icm (pour "defective for organelle trafficking/Intracellular multiplication") qui est codé par 25 gènes et présente une structure de type IVB (figure 16).

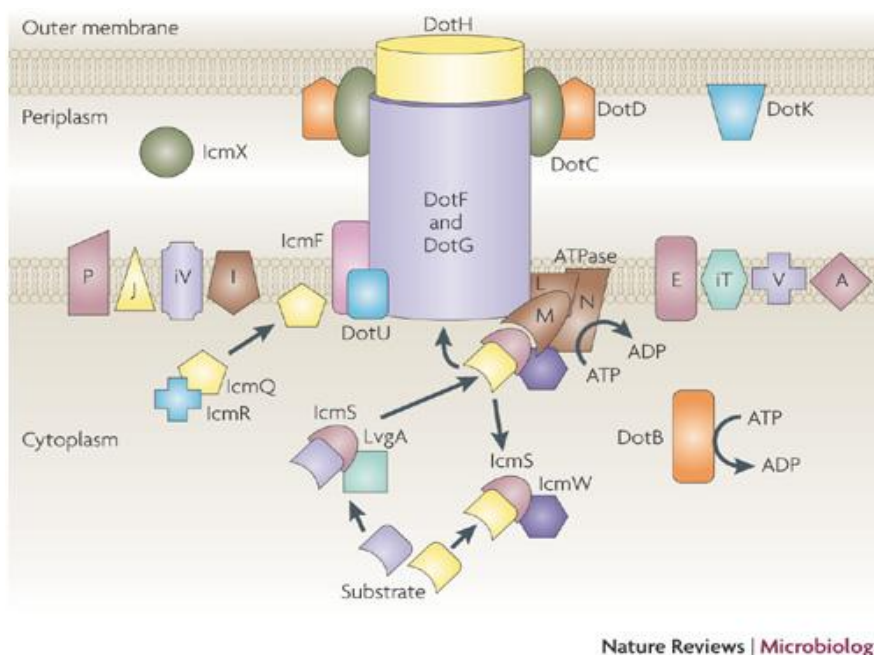


Figure 16 : Système de sécrétion Dot/Icm de *L. pneumophila* (Isberg *et al.*, 2009)

Différentes approches ont mis en évidence plus de 250 substrats potentiels, nommés effecteurs, pour ce système de sécrétion, dont seulement un petit nombre est associé à une étape identifiée du cycle intracellulaire de *L. pneumophila* (Isberg *et al.*, 2009) :

- adhérence et entrée dans les cellules hôtes impliquant la protéine LAiA (« *L. pneumophila* adhésion molécule with integrin Analogue of *S. cerevisiae* ») (Chang *et al.*, 2005) ;
- échappement à la voie endosomale : 79 protéines bactériennes surproduites chez l'hôte (LegC2, LegC3, LegC7...) entraînent un défaut du trafic endosomal. De plus, des mutants de *L. pneumophila*, déficients pour les gènes *lidA*, *lidB*, *lidL* ou *enhC* sont retrouvés dans une vacuole dépourvue du marqueur eucaryotique LAMP-1 ce qui suggère que ces protéines jouent un rôle dans le processus d'échappement à la voie endosomale (Conover *et al.*, 2003 ; Isberg *et al.*, 2009) ;
- Recrutement de réticulum endoplasmique sur la vacuole abritant *L. pneumophila* : les protéines SidM, SidD et LepB de *L. pneumophila* sont secrétées par Dot/icm et détournent la protéine Rab1 qui est une GTPase impliquée dans le trafic vésiculaire entre le Golgi et le réticulum endoplasmique (Neunuebel *et al.*, 2011) ;
- Contrôle du protéasome de l'hôte par des effecteurs présentant des domaines F-box, U-Box ou impliqués dans l'ubiquitination (de Felipe *et al.*, 2005 ; Kubori *et al.*, 2010) ;
- Contrôle de l'apoptose de l'hôte. Chez les mammifères, l'apoptose, ou programme de mort cellulaire, est induite par deux voies indépendantes déclenchées sous l'effet de stress et aboutissant à l'activation de caspases, qui sont des protéases à cystéine. *L. pneumophila* est capable de moduler ces voies chez les macrophages en sécrétant des signaux anti-apoptotiques (SidF, SdhA), dont certains interfèrent directement avec l'activation de l'expression de gènes anti-apoptotiques eucaryotes (Banga *et al.*, 2007 ; Ge *et al.*, 2009).

Il est intéressant de souligner que les souches Philadelphia, Lens et Paris, possèdent aussi une région *lvh* (« *Legionella vir homologues* ») qui code pour un système de sécrétion de type IVA, portée par un élément plasmidique qui peut aussi s'intégrer dans le chromosome bactérien (Doléans-Jordhein *et al.*, 2006). Si aucun effecteur de ce système n'a été identifié, il semble que ce système joue un rôle à 30°C.

L. pneumophila, comme *Yersinia sp.*, un autre pathogène intracellulaire, synthétise aussi un système de sécrétion de type II qui a été identifié sur la base d'une homologie avec PilD de *Pseudomonas*. Ce système est capable de libérer de nombreuses enzymes : métallo-protéases, Rnases, phosphatases acides, lipases, phospholipase A, lysophospholipase A, et l'acétyltransférase PlaC (de Buck *et al.*, 2007). Il semble que le rôle de ce système II soit important pour la survie et la multiplication des légionelles dans les poumons des mammifères. Enfin, le génome de la souche Paris de *L. pneumophila* abrite aussi un gène codant pour un possible système de sécrétion de type V qui est un auto-transporteur, c'est-à-dire une protéine avec une partie C-terminale qui forme un pore dans la membrane externe de la bactérie (de Buck *et al.*, 2004). Ni la fonctionnalité, ni les effecteurs de ce système n'ont été caractérisés jusqu'à ce jour. La multitude des systèmes de sécrétion et de leurs effecteurs associés reflète probablement la complexité des mécanismes qui contrôlent successivement les différentes étapes du cycle infectieux intracellulaire de *L. pneumophila*.

L'analyse des transcriptomes de quatre souches pathogènes provenant d'isolats cliniques (Lens, Paris, Philadelphia et Corby) a permis de déchiffrer les fonctions bactériennes plus spécifiques de chacune des deux phases du cycle intracellulaire bactérien (Jules et Buchrieser, 2007 ; Steinert *et al.*, 2007). Durant la phase de réplication (RE), sont surexprimés des gènes codant pour des complexes de polymérases, des facteurs de transcription, de traduction ou d'élongation, des protéines ribosomiques, et de nombreux gènes codant pour des voies métaboliques (catabolisme des acides aminés). Parmi les gènes surexprimés pendant la phase de transmission (T), on trouve des gènes codant pour des molécules ou des structures favorisant l'infection d'un nouvel hôte : régulateurs (FliA, CpxR, RpoE, protéines à motif GGDEF/EAL), le système de sécrétion Dot/Icm, et les facteurs de virulence qu'il sécrète (RalF, DotA...) ainsi que des composants du flagelle (figure 17).

Hors des phases RE ou T, les légionelles perdent leur capacité de croissance, mais non leur viabilité, suite à différents types de stress (carence nutritive, salinité, température...) : c'est l'état VBNC (« Viable but not cultivables ») qui conserve le métabolisme actif. Il est probable que dans l'eau froide des canalisations une forte proportion de légionelles libres soit dans un état VBNC qui est cependant réversible.

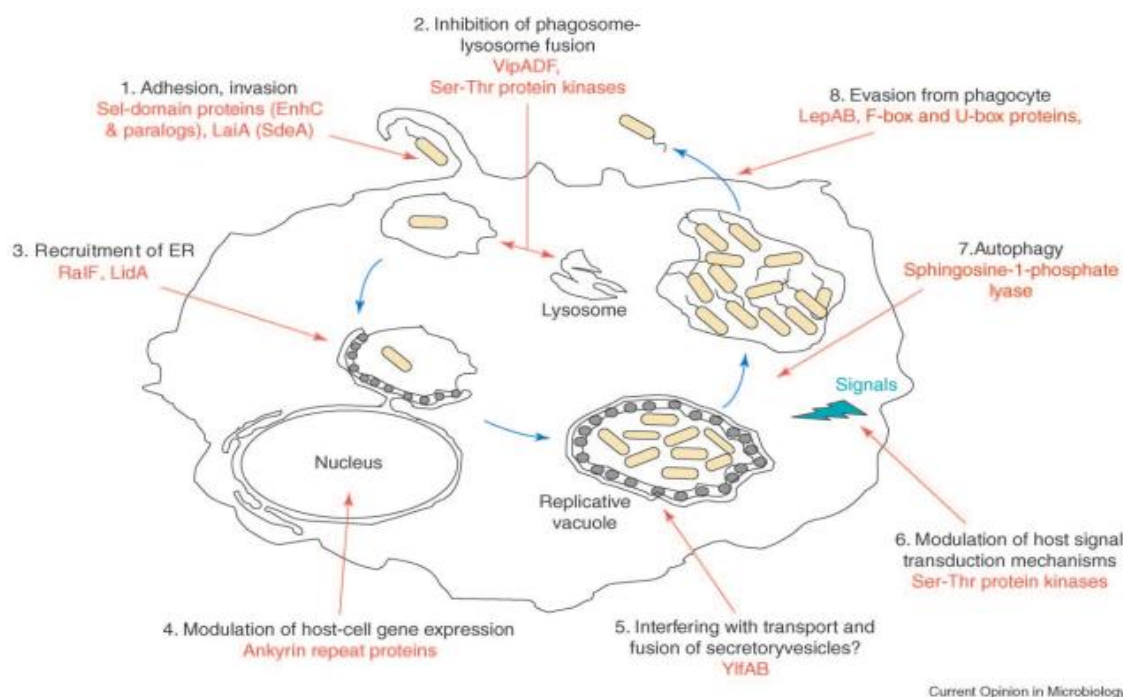


Figure 17 : Schéma des étapes de la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages et les protéines impliquées ou potentiellement impliquées dans le processus infectieux (Bruggemann *et al.*, 2006).

II.3.5 Ecologie des légionelles

L'eau représente le principal réservoir des légionelles ; ces bactéries sont des organismes ubiquitaires dans les environnements aqueux naturels ou artificiels. Ces bactéries ont été détectées après culture bactérienne dans 40 % des sources d'eau douce, et après PCR, dans 80% des sites d'eau douce. *L. longbeachae*, est tout de même une exception puisque elle est fréquemment isolée à partir de terreaux en Australie.

Les légionelles sont des bactéries acido-tolérantes et peuvent survivre à un pH de 2,0 pour de courtes périodes. Elles ont été isolées de sources environnementales ayant un pH de 3,0 à 8,3 (Anand *et al.*, 1983). Les environnements aquatiques naturels (lacs, rivières) sont rarement associés à des cas de légionelloses. C'est le développement industriel nécessitant des systèmes de refroidissement et l'altération des environnements naturels qui sont à priori à l'origine de l'émergence de la légionellose au 20^{ème} siècle.

II.3.5.1 *L. pneumophila* et l'état Viable mais non cultivable

Dans des conditions environnementales défavorables et en absence de cellule hôte *L. pneumophila* est capable d'entrer dans un état viable mais non cultivable (VBNC). L'état VBNC est défini comme un mécanisme de survie activé par les bactéries, en réponse à plusieurs contraintes environnementales et permettant aux microorganismes de conserver leur viabilité et leur intégrité membranaire, tout en perdant leur cultivabilité (Roszak *et al.*, 1984). L'état VBNC a été décrit pour la première fois chez *E. coli* et *Vibrio cholerae* (Xu *et al.*, 1982). Depuis, cet état physiologique a été décrit chez plus de 60 espèces bactériennes, pathogènes ou non (Oliver, 2005). Parmi ces conditions environnementales qui pourraient entraîner l'entrée des bactéries dans cet état la

privation nutritionnelle, les traitements thermiques, les UV, le pH, le stress oxydatif et osmotique ou encore des composés chimiques, notamment les biocides (Oliver *et al.*, 2010).

L'état VBNC a été décrit pour la première fois chez les légionelles par Hussong *et al.*, en 1987. En effet, suite à une épidémie de légionellose en 1985, des légionelles ont été détectées dans des échantillons provenant de l'hôpital de Stafford en Angleterre par une méthode immunologique alors qu'elles étaient indétectables par culture sur milieu gélosé. Les légionelles ont par la suite été 'revivifiées' à partir de ces prélèvements par culture dans des cellules d'embryon de poulet, ce qui a permis ensuite de les cultiver sur milieu gélosé.

Ainsi, les légionelles à l'état VBNC pourraient retrouver leur potentiel pathogène par le passage dans les amibes libres tel que *A. castellanii* et *A. polyphaga* (Steinert *et al.*, 1997 ; Garcia *et al.*, 2007). Il n'est donc pas exclu que les légionelles inhalées sous cette forme puissent être à l'origine d'infections humaines du fait de la similarité du processus infectieux vis-à-vis des amibes et des macrophages humains. Les méthodes d'énumération standards ne permettent pas de détecter les légionelles sous leur forme de VBNC (Diederer *et al.*, 2007.). Ceci entraîne la sous-estimation des concentrations réelles des légionelles présentes dans l'échantillon analysé, et par conséquent à la surestimation de l'efficacité des désinfectants utilisés.

II.3.5.2 Interaction de *Legionella* avec les amibes

Les exigences nutritionnelles de *L. pneumophila* sont très complexes (L-cystéine, fer). Ces exigences inhabituelles pourraient être contradictoires avec la présence ubiquitaire de *L. pneumophila* dans les milieux naturels généralement pauvres en facteurs de croissance. Pour survivre dans ces environnements défavorables, les légionelles adoptent un style de vie intracellulaire pour pallier au manque de nutriments dans l'environnement. Les légionelles sont capables de se multiplier dans 14 genres de protozoaire, majoritairement des amibes libres. Parmi ces genres amibiens, les genres *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Negleria* sont les genres les plus impliqués dans les pathologies humaines. Les amibes sont des organismes eucaryotes unicellulaires et ubiquitaires dans le sol et les environnements aquatiques. *Acanthamoeba* est la seule amibe isolée à partir d'eau marine (Greub *et al.*, 2004). Leur présence et leur diversité dans l'environnement dépend de la température, l'humidité, le pH et la disponibilité des nutriments. Les amibes se nourrissent par phagocytose de bactéries, d'algues et de champignons. Certaines sont qualifiées d'axéniques et sont par conséquent capables de survivre dans des milieux liquides sans particules où elles absorbent les nutriments par pinocytose (Bowers et Olszewski, 1972).

La plupart des amibes présentent deux stades de développement : un stade végétatif appelé trophozoite, qui est la forme répliquative, mobile, responsable de l'invasion des tissus, et un stade de dormance ou de résistance sous forme de kyste, permettant aux amibes de survivre à des conditions environnementales agressives dont l'absence de nutriments. La forme de Kyste est également considérée comme une forme de dissémination des légionelles notamment par l'air. Un autre stade, le stade flagellé, a été décrit uniquement chez le genre *Naegleria*. Le passage d'une forme à l'autre est fonction des conditions environnementales. Les amibes libres sont ubiquitaires et vivent particulièrement dans des biofilms qui représentent une source de nutriments (Loret et Creub, 2010 ; Rodriguez-Zaragoza, 1994).

La classification des amibes a longtemps été basée sur des critères morphologiques, notamment la forme et la taille des trophozoites et des kystes ainsi que leur mobilité. L'essor des

méthodes de biologie moléculaire a permis une classification plus précise, basée sur l'étude du génome et a permis de s'affranchir des critères morphologiques parfois non fiables.

Les Trophozoites d'*Acanthamoeba* se caractérisent par une taille plus grande que les autres espèces amibiennes et possèdent un diamètre de 25 à 40 μm . Le mouvement du trophozoite est assuré par des pseudopodes caractéristiques appelés « Acanthapodes » (figure 18). Les kystes sont à double membrane, de forme polygonale ou sphérique, de 15 à 20 μm de diamètre. Le genre *Acanthamoeba* a été subdivisé en 3 groupes distincts sur la base de la morphologie des Kystes, néanmoins cette morphologie s'est avérée variable en fonction des conditions de culture. Récemment, ce genre a été classifié sur la base des critères génétiques en 15 génotypes (Hsu *et al.*, 2009).

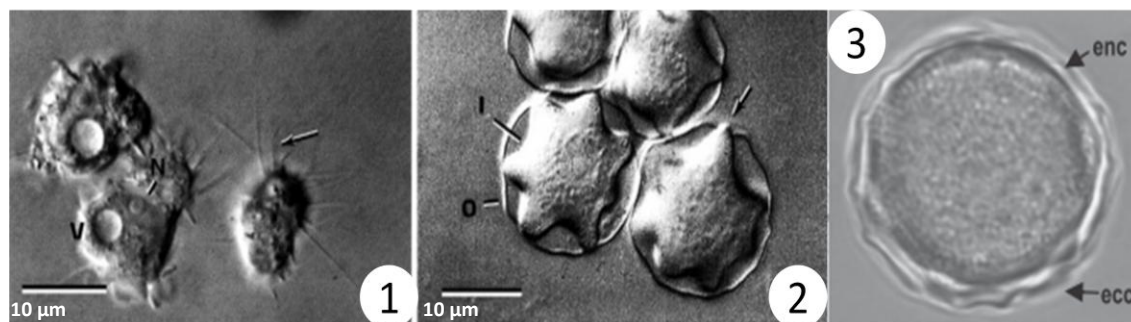


Figure 18 : Photos prises à l'aide d'un microscope à contraste interférentiel (1,2), (1) Trophozoites d'*Acanthamoeba*. La flèche désigne la projection de pseudopodes caractéristiques appelés acanthapodes (V) vacuoles (N) Noyau. (2) Kystes d'*A. comandoni*, la membrane du kyste est constituée de deux couches : endocyste (I) et ectocyste (O). Les Pores (ostioles) sont localisés à la jonction des deux couches (Flèches) (Schuster *et al.*, 2004). (3) Kyste d'*Acanthamoeba* observé par microscopie optique montrant l'ectocyste (ecc) et l'endocyste (enc) (Init *et al.*, 2010).

Les trophozoites d'*Hartmannella* sont caractérisés par une forme allongée, d'une longueur de 30 μm et d'une largeur de 6 μm . Cette amibe se déplace via un seul pseudopode (figure 19).

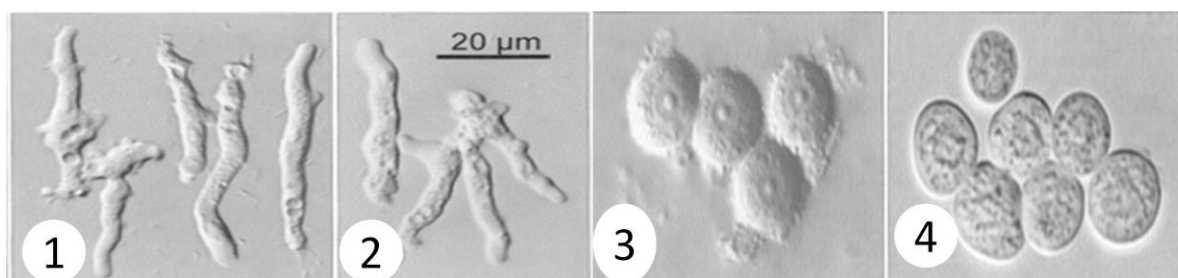


Figure 19 : Observation microscopique (microscope optique) des souches de *Hartmannella vermiformis* isolé de poisson (1 et 2) Trophozoites (3, 4) Kystes mature (Dykova *et al.*, 2005).

Les trophozoites de *Negleria* ont un diamètre de 10 à 15 μm . Les kystes ont une double membrane, de forme sphérique de 8 à 12 μm de diamètre. Les trophozoites de *Negleria* peuvent se transformer en une forme flagellée (figure 20).

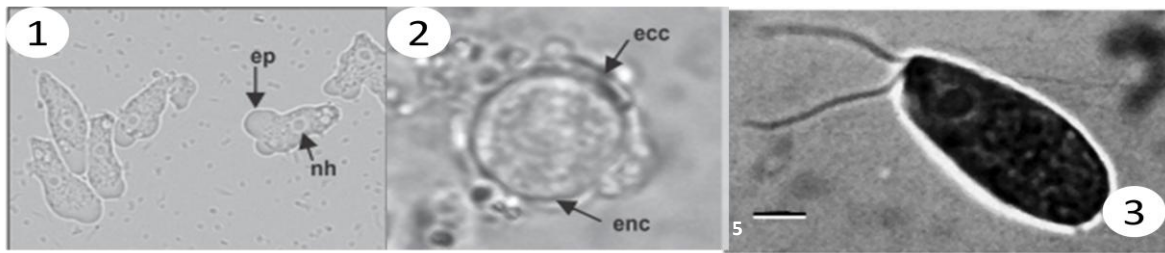


Figure 20 : Observation morphologique de *Negleria* en microscopie optique (1) Trophozoites montrant l'éruption des pseudopodes typiques appelés « Lobopodes » (ep) (2) Kyste montrant les deux couches membranaires : ectocyste (ecc) l'endocyste (enc) (Init *et al.*, 2010) (3) Formation de flagelles chez *N. fowleri* marqué par la trichrome, l'amibe est sous forme ovale, possède parfois jusqu'à 4 flagelles polaires. Le noyau est situé au pôle de l'amibe en étroite association avec le corps basal du flagelle (Schuster *et al.*, 2004).

Les légionelles peuvent également survivre dans les amibes enkystées qui sont par ailleurs très résistantes aux traitements biocides et constituent par conséquent un risque de persistance de *Legionella* après les traitements biocides curatifs ou préventifs. La compréhension du rôle des protozoaires dans l'écologie des légionelles est donc cruciale pour mettre au point des stratégies préventives.

La multiplication intracellulaire d'*A. castellanii* amplifie son pouvoir invasif vis-à-vis des cellules épithéliales et des macrophages. L'amibe augmente sa capacité de réplication dans les monocytes et les macrophages et devient par conséquent plus virulente (Cirillo *et al.*, 1994 ; 1999). La co-inhalation de *L. pneumophila* et de l'amibe *H. vermiformis* ou l'inhalation de cette amibe contaminée par des légionelles favorise la réplication de la bactérie dans les poumons de souris et augmente leur mortalité (Brieland *et al.*, 1996 ; 1997). Les études de Barker *et al.* montrent que le mode de vie intra amibien notamment dans l'amibe *A. castellanii* confère aux légionelles une meilleure résistance aux biocides et aux drogues antimicrobiennes (Barker *et al.*, 1992 ; 1993 ; 1995). Donlan *et al.* (2005) ont également démontré que la présence de *H. vermiformis* dans un biofilm contenant des légionelles améliore la résistance des bactéries à l'action du chlore et de la monochloramine. Chang *et al.* (2008) démontrent par ailleurs, que la résistance acquise suite à la multiplication intra-amibienne est souche dépendante. En effet, ils ont démontré que l'association de *L. pneumophila* à *H. vermiformis* lui confère une résistance davantage qu'une association avec l'amibe *A. castellanii*. Il faut signaler que l'efficacité des biocides vis-à-vis des protozoaires est rarement étudiée. Dans une étude récente, Loret et Greub (2010) démontrent que les amibes libres résistent aux traitements appliqués aux eaux de consommation et constituent un risque de persistance des légionelles. Lorsque les traitements sont interrompus, les légionelles se multiplient de nouveau très rapidement ce qui laisse supposer la persistance de leur hôte (Thomas *et al.*, 2004). Tous ces éléments permettent de mettre en évidence le fait que les amibes affectent profondément la physiologie et l'écologie des légionelles et favorise leur survie dans des conditions environnementales inadéquates et leur dissémination en grand nombre. D'un point de vue écologique, le mode de vie intra-amibien constitue un facteur de dissémination des souches virulentes de *L. pneumophila* par rapport aux souches avirulentes qui sont incapables d'infecter les amibes.

Les légionelles infectent généralement les amibes sous forme trophozoites. L'enkystement des amibes sous l'effet de conditions environnementales défavorables permet de renfermer des légionelles dans ces kystes. Le phénomène d'enkystement a été mis en évidence chez plusieurs espèces d'amibes notamment chez *Negleria* et chez *Acanthamoeba* ssp. Ces kystes, qui sont des formes de résistance des amibes vis-à-vis de concentrations très élevées de biocides, seraient à l'origine de la réapparition des légionelles après les épisodes de décontamination (Declerck *et al.*,

2005 ; Bouyer et al., 2007). En effet une concentration de 50 mg /L de chlore ne détruit pas les légionelles dans les kystes amibiens d'*A. polyphaga* alors que 3 minutes d'exposition au chlore à 2 mg /L tue les légionelles planctoniques (Kilvington *et al.*, 1990 ; Miyamoto *et al.*, 2000 ; Greub et Raoult, 2003).

Pendant la réplication intracellulaire des légionelles, certaines amibes produisent également des vésicules (MIF) d'une taille qui varie de 2.1 à 6 µm. Ces vésicules ont été mis en évidence chez des amibes du genre *Acanthamoeba* (figure 21) (Berk *et al.*, 1998 ; Bouyer *et al.*, 2007) mais également chez des amibes du genre *Hartmannella* (Greub et Raoult, 2003). Elles peuvent contenir quelques centaines de légionelles virulentes et du fait de leur taille respirable, elles constituent un facteur de transmission des légionelles lorsqu'elles sont transportées par des aérosols. Des *Legionella* viables ont été détectées dans des vésicules qui ont été exposées à un traitement biocide de 24 h dans des TARs. Ces vésicules fournissent donc une protection vis-à-vis des traitements biocides (Berk *et al.*, 1998) et antibiotiques (Bouyer *et al.*, 2007).



Figure 21 : Photo d'une vésicule d'*A. castellanii* prise par au microscope électronique à transmission. Barre= 1µm (Berk *et al.*, 1998)

L'existence de ces vésicules expliquerait la possibilité qu'une TARs contenant un nombre relativement faible de légionelles sous forme libre puisse être une source d'aérosols contenant une dose infectieuse et par conséquent une source de légionellose (paradoxe de la dose infectieuse).

II.3.5.3 Interaction de *Legionella* avec les biofilms

La majorité des légionelles sont associées à des biofilms, il est en effet plus facile d'isoler ces bactéries à partir de biofilms qu'à partir d'eau circulante. L'utilisation de biofilms comme indicateur d'efficacité de biocides vis à vis des légionelles, généralement évalué sur des bactéries en suspension, représente donc une perspective très intéressante.

Le biofilm constitue un habitat favorable au développement des légionelles (et d'autres bactéries). Certains chercheurs ont suggéré que les légionelles sont capables de survivre dans le biofilm indépendamment des amibes (Kusnetsov *et al.*, 1994 ; Storey *et al.*, 2004). En l'absence de protozoaires *L. pneumophila* persiste dans un état viable pendant environ 15 jours au sein d'un biofilm reconstitué. L'ajout de *H. vermiformis* ou d'*A. castellanii* dans ces systèmes permet aux légionelles de se multiplier (Murga *et al.*, 2001 ; Declerck *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que les légionelles associées aux biofilms utilisent les amibes comme support de croissance et de

multiplication mais aussi comme vecteurs de transmission vers d'autres environnements plus favorables.

Les biofilms associés aux légionelles et aux protozoaires se développent sur les surfaces de certaines installations de refroidissement d'eau notamment dans les tours aéro-réfrigérantes. Le biofilm constitue une source de nutriments et protège les microorganismes de l'action des traitements chimiques et physiques appliqués dans ces installations. La sensibilité des populations planctoniques et sessiles de *L. pneumophila* à un traitement biocides est différente. Sanli-Yurudu *et al.* (2007) montrent que La chloramine T trihydratée appliquée aux concentrations recommandées par le fournisseur (0,1-0,3%) s'est avérée uniquement efficace vis-à-vis des populations planctoniques. L'application de 1 mg/L aboutit à un abattement de > 5 Log des légionelles cultivables planctoniques qui deviennent indétectables après 24 h d'exposition tandis que des doses plus élevées (15000 et 10000 mg/L) sont nécessaires pour aboutir à des abattements significatifs des populations sessiles. Ce résultat démontre que l'étude de l'effet des biocides uniquement sur les populations planctoniques n'est pas suffisante pour déterminer les concentrations optimales de traitements des TARs.

II.3.6 Méthode d'identification et de caractérisation des légionelles

II.3.6.1 Méthodes de diagnostic

Les symptômes cliniques de l'infection par *L. pneumophila* sont similaires aux symptômes d'autres pneumonies. Des méthodes de diagnostic précises sont donc nécessaires pour identifier *Legionella* et fournir la thérapie appropriée. Outre l'aspect thérapeutique, l'identification des légionelles responsables de cas cliniques est nécessaire pour déterminer les sources environnementales de la bactérie. Ceci permet de mettre en œuvre des mesures curatives et préventives pour éviter de nouveau cas de façon efficace.

Malgré la disponibilité de méthodes immunologiques et moléculaires, le diagnostic de cette maladie est essentiellement efficace pour *L. pneumophila* sg 1. La sensibilité et la spécificité des méthodes d'identification d'autres sérogroupes et d'autres espèces de *Legionella* sont encore loin d'être parfaits.

Le diagnostic de la légionellose est basé sur plusieurs méthodes de laboratoire, les principales techniques actuellement utilisées sont :

- l'isolement de la bactérie sur des milieux de culture ;
- l'identification sérologique de la bactérie ;
- la détection d'un antigène urinaire ;
- le sérodiagnostic dans les tissus ou les fluides physiologique par immunofluorescence
- la détection de l'ADN bactérien après amplification par une technique de PCR (polymerase chain reaction).

II.3.6.1.1 Culture

La culture sur milieu solide des légionelles demeure à ce jour la méthode de référence. Cette culture se fait principalement sur deux milieux : le α -BCYE (Feeley *et al.*, 1979) et le GVPC (Wadowsky et Yee, 1981 ; Edelstein, 1982). En France la méthode d'isolement et d'identification des légionelles est normalisée (NFT90-431). Cette norme comporte plusieurs étapes, notamment un traitement thermique et un traitement acide qui contribuent à l'inhibition de la flore annexe qui pourrait également se développer sur le BCYE. Le milieu GVPC a un caractère sélectif, ce milieu est en effet une variante du milieu BCYE supplémenté de certains antibiotiques auxquels *Legionella* est

résistante (Wadowsky et Yee, 1981 ; Edelstein, 1982) : La polymyxine B, l'anisomycine et cefamandole ou la vancomycine pour l'inhibition de la flore gram-négative, des levures, et de la flore gram-positif respectivement. La vancomycine devrait être privilégiée dans le cas d'isolement des espèces autre que *pneumophila*, du fait que la cefamandole inhibe les espèces de *Legionella* qui ne produisent pas de β -lactamases (*L. micdadei*) (Lee *et al.*, 1993). Vickers *et al.* démontrent également que la cefamandole inhibe quelques souches de *L. pneumophila* (Vickers *et al.*, 1992).

La spécificité de cette méthode est différente selon la provenance de l'échantillon. Pour les diagnostics cliniques de la légionellose, la spécificité de la méthode est d'environ 60% avec, un intervalle de 30 à 80% (Ramirez et Summersgill, 1994). L'origine de l'échantillon clinique est également un facteur de réussite de l'isolement des légionelles. L'expectoration est généralement inappropriée et déconseillée du fait que la légionellose est accompagnée d'une toux sèche et d'autres infections respiratoires. De plus les antibiotiques présents dans le tractus respiratoire administrés pour le traitement de l'infection peuvent empêcher la croissance des légionelles *in vitro*. La baisse de la sensibilité de la méthode pourrait également être la conséquence d'un passage à l'état VBNC (Maiwald *et al.*, 1998). Enfin, Cette technique ne permet pas la détection des légionelles contenues dans les protozoaires.

Cette méthode, bien que normalisée, est consommatrice de temps et nécessite souvent d'autres tests immunologiques et moléculaires pour une identification précise des souches de *Legionella* notamment pour les études épidémiologiques.

II.3.6.1.2 Méthodes immunologiques

II.3.6.1.2.1 Test sérologique indirect et immunofluorescence

Cette méthode est basée sur la recherche d'anticorps anti-*Legionella* par immunofluorescence indirecte (IFI ou IFAT : indirect fluorescent antibody test). Elle repose sur la reconnaissance dans le prélèvement d'anticorps anti-LPS de *Legionella* par des anticorps anti-humain couplés à la fluorescéine ; le test immunoenzymatique « ELISA » est également utilisé.

Le diagnostic de la légionellose par la sérologie représente un outil performant pour les études épidémiologiques mais peu adapté pour le diagnostic clinique. Les résultats de ce test sont généralement obtenus très tardivement après les premiers symptômes de l'infection. Ceci est la conséquence du temps nécessaire à la réponse immunitaire et à la production des anticorps. De plus, des titres anticorps résiduels parfois élevés ont été détectés chez de nombreux patients anciennement infectés par *L. pneumophila* (Plouffe *et al.*, 1995), ce qui complique le diagnostic en cas de nouvelle infection.

II.3.6.1.2.2 Détection des légionelles par immunofluorescence direct

Il s'agit d'une procédure rapide pour la détection des légionelles dans les prélèvements respiratoires. Cette technique se base sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux vis-à-vis de la protéine MOMP. Ces anticorps reconnaissent l'ensemble des sérogroupes de *L. pneumophila*. Cette technique peut également être utilisée pour l'identification des colonies obtenues par culture.

Des tests d'agglutination latex sont également utilisés pour l'identification des colonies de légionelles et permettent d'identifier précisément les sérogroupes de 1 à 15. Leur principe est basé sur la réaction antigène-anticorps. Les kits contiennent en générale des particules de latex bleu sensibilisées par des anticorps de lapin spécifiques réagissant avec les antigènes des différents sérogroupes de *L. pneumophila* et les antigènes de certaines espèces de *Legionella*.

II.3.6.1.2.3 Détection de l'antigène soluble urinaire

La nature exacte de l'antigène urinaire de *Legionella* demeure inconnue mais un LPS en représente le majeur constituant. Cet antigène a été caractérisé pour la première fois par Kohler *et al.* (1981) qui le décrivent comme thermostable, résistant au clivage enzymatique et d'une taille de 10 kDa.

La détection de cet antigène se fait à l'aide de trois techniques :

- radio-immunologique, l'anticorps secondaire est radiomarqué ;
- immunoenzymatique, l'anticorps secondaire est couplé à une enzyme dont l'activité pourra ensuite être détectée par l'ajout d'un substrat ;
- immuno-chromatographique, basée sur la migration d'anticorps anti-LPS.

Les dosages immunoenzymatique (ELISA) et immuno-chromatographie sur membrane sont actuellement les méthodes agréés par l'ANSM (anciennement AFSAPS) en France. Plusieurs études cliniques montrent que la spécificité de ces tests est de 100%, et la sensibilité varie entre 70 et 100%. La concentration des urines améliore la spécificité et la sensibilité de ce test. Cependant cette spécificité et sensibilité élevées ne sont applicables qu'à *L. pneumophila* sg 1. L'utilisation d'un nouvel antigène : PAL, (peptidoglycan-associated lipoprotein) notamment dans des tests ELISA, permettrait d'étendre le diagnostic aux sérogroupes 3, 4, 5 et 6, et à d'autres espèces comme *L. micdadei*, *L. jordanis*, *L. oakridgensis*, *L. anisa*, *L. gormanii*, et *L. sainthelensi* (Kim *et al.*, 2003). Concernant *L. longbeachae*, reconnue pour être responsable d'environ 50% des cas de légionellose en Australie, il n'existe pas de test urinaire commercialisé.

Les principaux avantages de la détection de l'antigène urinaire pour le diagnostic de la légionellose sont principalement :

- 1- la facilité de collecte des urines ;
- 2- la détection rapide après les premiers symptômes et même en parallèle de l'antibiothérapie ;
- 3- la rapidité : les résultats sont généralement obtenus après moins de 4h pour le test ELISA et moins de 15 minutes pour l'immuno-chromatographie.

II.3.6.1.3 Méthodes moléculaires

La détection des acides nucléiques de *Legionella* après amplification génique (PCR) ne constitue pas un moyen de diagnostic en Europe. La PCR est en effet utilisée uniquement pour la détection des bactéries du genre *Legionella* dans l'environnement. Le dénombrement quantitatif des légionelles dans l'environnement et les installations industrielles se fait également en utilisant la PCR quantitative (q-PCR). Cette technique est normalisée et généralisée dans les laboratoires d'analyses (XPT90-471, avril 2006 ; NfT 90-471, avril 2010). Aucune équivalence n'est actuellement établie entre la méthode par culture (NF T90-431) et par q-PCR (Nf T90-471) (résultats exprimés en UFC/ml et UG/ml). La technique de q-PCR est basée sur la quantification des unités génomiques contenues dans un échantillon sans tenir compte de la viabilité des cellules. Ceci peut entraîner la surestimation du risque légionellose et donc un risque de faux positifs. Néanmoins, elle permet de détecter les légionelles intra-protozoaires et intravésiculaires limitant ainsi les risques de faux négatifs liés à la présence de protozoaires et de vésicules dans l'échantillon analysé. Cette norme n'exige pas d'amorce précise ; elle laisse le choix des amorces à condition qu'elles soient spécifiques aux légionelles. Les principaux gènes ciblés dans cette technique sont l'*ARNr 16s*, le gène *mip* ou encore l'*ARNr 23s* et le gène *rpoB* (Yong *et al.*, 2010).

D'autres amorces spécifiques du sg 1 de *L. pneumophila* ont récemment été proposées par Mérault *et al.* (2011) et permettent de quantifier *L. pneumophila* sg 1 par l'amplification des gènes *wzm* et *wzt* qui appartiennent au groupe *lps* et codent pour un ABC transporteur spécifique du sg1.

II.3.6.2 Méthodes de typage

La technique de PCR permet également de détecter sélectivement dans l'environnement les *Legionella spp*, les *Legionella pneumophila* et des *Legionella pneumophila* sg 1 en utilisant des gènes spécifiques à chaque groupe (Yong *et al.*, 2010 ; Mérault *et al.*, 2011). Elle constitue ainsi un outil de détection et de caractérisation rapide et performant, notamment des isolats obtenus par culture.

D'autres méthodes moléculaires de typage sont utilisées notamment dans les enquêtes épidémiologiques afin de déterminer les sources de contamination. Actuellement, quatre de ces méthodes sont généralement utilisées : une méthode immunologique basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Mab, Monoclonal AntiBodies) et trois méthodes moléculaires dont le principe repose sur la variabilité des acides nucléiques des isolats : l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) et le SBT (Sequence-Based Typing) (Fields *et al.*, 2002 ; Hilbi *et al.*, 2010).

Brièvement, Les anticorps monoclonaux utilisés dans la méthode immunologique (MAB) ciblent des LPS de la membrane externe des légionelles. Les méthodes moléculaires sont basées sur la diversité des acides nucléotidiques des isolats et sur des méthodes de digestion enzymatique, d'amplification spécifique, de migration (PFGE et AFLP) et de séquençage (SBT). L'AFLP à l'avantage d'être simple d'utilisation et rapide (entre 24 et 48 heures) (Fry *et al.*, 2000). Bien que cette méthode soit normalisée au niveau international, son utilisation diminue par rapport aux autres techniques. La PFGE est la méthode de typage la plus utilisée en France pour le typage des légionelles (Riffard *et al.*, 1998). Néanmoins cette méthode est consommatrice de temps et coûteuse en terme de matériel nécessaire pour sa réalisation. La technique SBT développée par le groupe européen EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) est caractérisée par sa reproductibilité mais elle est moins efficace que la PFGE pour la discrimination des souches de *Legionella*. Le couplage de cette technique au sérotypage à l'aide d'anticorps monoclonaux améliore ses capacités (Ratzow *et al.*, 2007).

Le séquençage de certains gènes est également utilisé pour les études de phylogénie et l'identification des isolats environnementaux notamment les gènes *ARNr 16s*, *rpoB* et *mip*, le gène *mip* représentant une cible privilégiée. En effet, Le gène *mip* est stable, retrouvé chez toutes les espèces de légionelles et présente une zone hypervariable de 51 pb, située immédiatement en aval de la région en 5' codant pour la séquence signal (Ratcliff *et al.*, 1998). De plus la séquence génique du gène *mip* présente un pouvoir discriminant supérieur à celui de l'*ARNr 16s* (Ratcliff *et al.*, 1997).

II.3.7 Techniques d'échantillonnage des biofilms

II.3.7.1 Cas général

Un bon suivi des eaux et des biofilms est un pré-requis pour le bon suivi et le contrôle du développement des biofilms ainsi que pour l'optimisation des traitements de désinfection par les biocides. L'échantillonnage doit donc être représentatif du biofilm naturel. Dans les études effectuées en laboratoire, le biofilm se développe sur des substrats artificiels (coupons en PVC, lames de verre, coupons en acier Inoxydable ou en cuivre...). Il est ensuite récupéré par grattage

et/ou par traitement ultrason et mis en suspension dans un liquide stérile (par exemple l'UHQ : eau ultra pure ou eau physiologique à 0,6% de NaCl) pour subir les analyses. Cet échantillonnage est souvent accompagné d'un prélèvement du liquide afin de pouvoir effectuer les analyses sur la phase aqueuse. Ceci permet d'avoir des informations complémentaires sur la composition microbiologique de la phase liquide et des surfaces (biofilms).

Dans les milieux naturels il est également possible de laisser se développer le biofilms sur un substrat artificiel et de récupérer ensuite le support pour récolter le biofilm par grattage de la surface (ou par ultrason également). Ceci est également possible dans le cas des circuits d'eau potable (ou des eaux de refroidissement). Dans ces cas on laisse des coupons (lames) qu'on laisse *in situ* pour une durée déterminée puis on récupère les coupons et le biofilms directement à partir des surfaces de ces coupons.

Les besoins de la recherche exigent parfois de récupérer le biofilm sur son support naturel. Certains supports naturels sont de petites tailles (les pierres dans les rivières) et il est possible de les transporter au laboratoire pour l'analyse. D'autres supports sont fixes (le cas des TARs) et de grande taille, leur configuration ne permettant pas alors de les transporter. Dans ce cas il est nécessaire de faire l'échantillonnage *in situ*, mais à l'heure actuelle aucun matériel d'échantillonnage standardisé n'est disponible à cet effet. Dans la plupart des cas l'alternative d'un substrat artificiel ajouté dans ces milieux s'impose pour s'affranchir du problème de l'échantillonnage.

Un inconvénient majeur met des limites à l'utilisation des substrats artificiels dans les milieux naturels (milieux aquatiques) et industriels. Il s'agit de la nature de ces substrats artificiels qui est souvent différente de la nature des supports naturels ou industriels. En effet la nature du support est un facteur qui influence le développement et les caractéristiques du biofilm. La nature du substrat sur lequel se développe le biofilms induit des différences fondamentales dans la structure du biofilms (Hoellein et al., 2010). Ces différences peuvent se manifester en termes de diversité des biofilms et de charges microbienne (Hunt et Parry, 1998). Du fait de leur inertie, les coupons inorganiques favorise les organismes autotrophes en relation avec la carence en carbone organique qui limite le développement des hétérotrophes, favorisés sur des supports organiques (Hoellein et al., 2010). Le cuivre est un support défavorable au développement du biofilm, il diminue à la fois la concentration et la diversité bactérienne, ce type de substrat est également responsable de la disparition des protistes. A forte dose ce métal peut avoir un effet inhibiteur sur *L. pneumophila*. Le cuivre est largement utilisé dans les canalisations mais son effet inhibiteur disparaît après deux ans d'utilisation (Rogers et al., 1994 b). Rogers et al. (1994 b) montrent également que des surfaces en latex et en éthylène-propylène favorisent mieux le développement des biofilms et *L. pneumophila* en comparaisons avec : le PVC, l'acier inox et l'acier doux. Ce résultat est expliqué par le relargage du carbone organique à partir de ces matériaux favorisant le développement des biofilms. L'inox et les matières en plastique sont beaucoup plus propices à la présence de légionelles dans les biofilms par rapport au verre et au cuivre, ces deux matière favorisent également la présence de l'ensemble des bactéries dans le biofilm mais d'une manière moins importante (Rogers et al., 1994 b). Witt et al. (2011) montrent que le verre permet un développement des biofilms équivalent à celui des squelettes de corail. En conclusion, le biofilm qui va s'y développer ne reflètera pas forcément les caractéristiques du biofilm naturel si la nature des substrats est différente. Cette remarque est d'autant plus importante que lors des études d'efficacité de biocides, la concentration et la composition des biofilms jouent un rôle crucial dans la performance de ces derniers.

Dans les canalisations d'eau, le substrat artificiel est souvent constitué de coupons dont la nature est celle de la canalisation souvent fabriquée en cuivre. Le biofilm se développe sur ces coupons qui sont prélevés pour l'échantillonnage. Le biofilm est ensuite mis en suspension par des traitements mécaniques ou physiques. Il est très important lors de l'échantillonnage de conserver une certaine humidité des échantillons. Le transport au laboratoire se fait dans des chambres humides à basse température.

II.3.7.2 Cas spécifique des TARs

Les TARs représentent des écosystèmes idéaux au développement microbien en suspension et sur les surfaces (biofilms). Les TARs constituent donc un réservoir potentiel de microorganismes et notamment les microorganismes pathogène tel que *L. pneumophila*. Comme pour tous les écosystèmes naturels, la concentration des microorganismes en suspension ne donne aucune information sur la concentration de la biomasse du biofilm. Les microorganismes alternent continuellement les états sessile et Libre.

Actuellement, le suivi microbiologique de ces systèmes s'effectue directement sur la phase aqueuse et non pas sur le biofilm. Les normes microbiologiques imposent des critères microbiologiques dans l'eau et négligent complètement le biofilm, alors que le biofilm est le réservoir principal de ces microorganismes. De plus, le passage des microorganismes du biofilm à l'état libre est influencé par plusieurs paramètres, notamment l'hydrodynamique. Il se fait d'une façon aléatoire et peut par conséquent biaiser les analyses microbiologiques effectuées sur le fluide à un temps T.

Le prélèvement d'échantillons à partir de la phase aqueuse est relativement simple, il consiste à prélever stérilement une quantité d'eau suffisante à partir de la phase aqueuse. Ce prélèvement s'effectue en général à partir du point de vidange ou de déconcentration, du bassin collecteur ou en amont de la pulvérisation (Wery *et al.*, 2008). Les analyses donneront des informations sur la charge microbiologique de l'eau au moment du prélèvement. Cette charge microbiologique est transitoire à cause des apports et des destructions continues de microorganismes. Les apports sont assurés par le circuit de refroidissement et par le détachement des microorganismes à partir du biofilm sous l'influence des forces de cisaillement biocides et la mort naturel des microorganismes. Il est donc très important de coupler l'analyse des fluides avec celle des biofilms et d'orienter les traitements de désinfection vers la destruction des bactéries en suspension et dans les biofilms qui constituent un réservoir et une protection pour ces bactéries.

II.3.8 Techniques d'analyse des biofilms

A l'heure actuelle il existe une multitude de techniques de laboratoire qui permettent d'analyser le biofilm et de caractériser sa composition biologique et chimique. Ces analyses utilisent des techniques microscopiques, microbiologiques et moléculaires afin de donner des informations sur la composition globale et spécifique du biofilm. Mises à part les techniques standardisées (conventionnelles), il existe des techniques en développement plus sophistiquées qui pourront donner d'avantage d'information sur les biofilms. Ces techniques seront brièvement abordées dans ce paragraphe. Il est évident que dans le cadre du suivi opérationnel et continu de la qualité des eaux, les industriels utilisent des techniques rapides et peu coûteuses pour des raisons économiques.

II.3.8.1 Analyses globales

II.3.8.1.1 Biomasse bactérienne totale

Il existe deux techniques qui permettent d'avoir une estimation de la biomasse bactérienne globale du biofilm, l'une est basée sur le dénombrement des bactéries totales cultivables en milieux solides non sélectifs (parfois sélectif si on recherche un groupe ou une espèce bactérienne particulière). L'autre est basée sur l'observation microscopique des bactéries totales (vivantes, VBNC et mortes) après un marquage non spécifique.

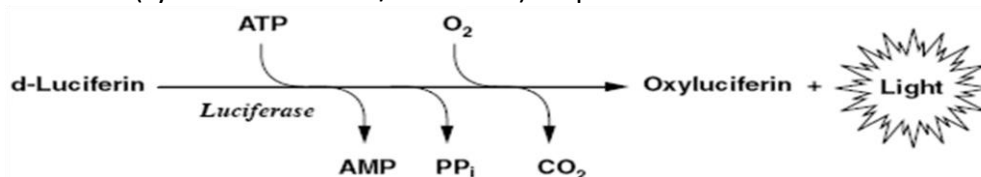
La technique culture dépendante est la technique la plus utilisée pour le monitoring de la qualité des eaux. Cette technique nécessite l'ensemencement des suspensions du biofilm sur milieu gélosé puis l'incubation à une température qui avoisine 20 °C pendant une période suffisamment longue (5 à 7 jours) afin de permettre le développement des bactéries à croissance lente. Dans cette technique il est possible d'ensemencer directement les suspensions de biofilm sur la gélose ou d'effectuer une filtration préalable, puis de déposer le filtre sur la gélose.

Cette technique représente un inconvénient majeur qui concerne toutes les techniques microbiologiques cultures dépendantes : elle permet l'énumération uniquement des bactéries cultivables sur le milieu utilisé. Ceci engendre une sous estimation du nombre réel de bactéries dans l'échantillon. En effet, dans l'environnement, il existe une portion de bactéries métaboliquement actives mais qui ne sont pas cultivables sur le milieu utilisé (VBNC : Viable But Non Culturable). Ceci est dû à la non adéquation du milieu de culture utilisé avec les besoins nutritifs des bactéries. L'état VBNC peut également correspondre à un état physiologique transitoire, représentant une forme de différenciation face aux stress environnementaux et qui ne permet pas aux bactéries de se développer sur les milieux de laboratoire.

La deuxième technique nécessite l'observation directe par microscopique à épifluorescence après marquage. La technique est basée sur le marquage non spécifique de l'ADN avec un agent fluorescent, le 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Le marquage et l'observation microscopique peuvent se faire directement sur la suspension du biofilm ou sur un filtre. Cette technique n'est pas utilisée pour le suivi opérationnel des eaux mais uniquement à des fins de recherche. Elle présente l'inconvénient de la surestimation de la charge bactérienne. En effet, l'agent fluorescent se fixe sur l'ADN de toute les bactéries : vivantes, VBNC et mortes et l'observation microscopique ne permet pas de différencier ces formes bactériennes. D'où la nécessité de coupler cette technique à la technique microbiologique culture dépendante et aux techniques d'évaluation de la viabilité cellulaire.

II.3.8.1.2 Activité métabolique globale du biofilms

L'activité métabolique peut constituer un indicateur de la charge microbienne dans un milieu naturel ou dans le biofilm. Elle est basée sur l'estimation du pool des adénylates dans l'échantillon prélevé. Les adénylates sont extraites de l'échantillon puis quantifiées par bioluminescence (système luciférine/luciférase) ou par HPLC.



Cette réaction est basée sur l'oxydation de la luciférine par la luciférase en présence d'ATP et d'oxygène produisant de l'oxyluciférine et de la lumière. A des concentrations de luciférine/luciférase et d'oxygène stable, l'intensité de la lumière est proportionnelle à la quantité d'ATP. Les valeurs obtenues sont exprimées en unité relative de lumière (URL), il est ensuite possible d'estimer la quantité d'ATP par comparaison à des valeurs obtenues par l'injection de quantités d'ATP connues.

Cette mesure donne des informations sur l'activité métabolique du biofilms et par conséquent sur l'état physiologique de la biomasse. Néanmoins elle ne donne pas d'informations précises sur la charge en biomasse dans un biofilm, mais reflète uniquement son activité métabolique. Cette technique reste tout de même une technique largement utilisée dans le suivi microbiologique due à la présence de Kits commerciaux facilement utilisables et à la rapidité des mesures.

Il existe à l'heure actuelle des kits commerciaux pour tester la viabilité des cellules microbiennes (tel que le kit live/dead, Merck Millipore).

II.3.8.1.3 Techniques en développement

Tanji *et al.* (2007) ont développé une technique pour évaluer l'activité biologique du biofilm ou des microorganismes en suspension. Cette technique est basée sur l'évaluation du taux de consommation des substrats organiques. Ils ont démontré que la consommation d'acide lactique est un bon indicateur de l'activité biologique du biofilm.

Berney *et al.* (2008) décrivent également une technique rapide pour l'évaluation de la viabilité cellulaire dans l'eau de consommation. Cette technique combine des techniques basées sur la fluorescence (intégrité membranaire, le potentiel membranaire et l'activité estérase), la cytométrie en flux et le taux d'ATP.

II.3.8.2 Analyse spécifiques

L'analyse spécifique des biofilms dépend des objectifs recherchés et le contexte du suivi. Selon le secteur d'activité, les microorganismes recherchés et qui sont susceptibles de représenter des dangers vis-à-vis de la santé publique sont différents. Par exemple, dans le secteur agroalimentaire, ce sont plutôt des microorganismes susceptibles de se transmettre via la consommation des produits alimentaires ou encore capables de provoquer des défauts de fabrication qui sont recherchés. Dans le cas des eaux de consommation (eau potable) ou de refroidissement (TARs), on recherche des microorganismes susceptibles de se transmettre via la consommation d'eau ou la respiration de gouttelettes d'eau chargées de microorganismes pathogènes tel que *L. pneumophila*. Dans les laboratoires de recherche, ces analyses concernent également d'autres groupes ou espèces microbiennes. Nous nous limitons ici à la description des techniques utilisées dans le suivi des eaux et des biofilms dans le contexte des TARs.

II.3.8.2.1 *L. pneumophila*

Les techniques de recherche des légionelles sont les mêmes que celles appliquées aux suspensions bactériennes puisqu'elles sont appliquées au biofilm après sa mise en suspension. C'est la technique de dénombrement sur milieu de culture spécifique (GVPC : Glycine, Vancomycine, Polymixine B, Cycloheximide agar ou GVPN : Glycine, Vancomycine, Polymixine B, Natamycine agar) qui est la plus utilisée en correspondance avec la norme AFNOR NF T90-431.

Dans le cas des TARs, la suspension à analyser peut, au préalable, être concentrée par filtration. Elle subit un traitement dit de décontamination, visant à éliminer au mieux les autres composantes des communautés microbiennes (traitement thermique : 50°C pendant 30 min et

acide : pH 2,2 pendant 5 min). Elle est ensuite étalée sur le milieu gélosé (GVPC) et incubée à 36°C si possible sous atmosphère enrichie à 2,5% de CO₂, pendant 10 jours. Les boîtes sont examinées aux jours 3, 7 et 10. Les colonies positives se caractérisent, le plus souvent, par une coloration gris-bleu clair. Elles deviennent blanchâtres en vieillissant avec un bord net rosé et un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire. Après repiquage, elles font l'objet de tests d'identification par sérotypage ou à l'aide de techniques moléculaires.

La seconde technique normalisée de dénombrement des légionelles est basée sur une PCR en temps réel (RT-PCR) définie par la norme NF T90-471, récemment homologuée (avril 2010).

Dans les laboratoires de recherche, les dénombrements de légionelles font aussi appel à des techniques d'immunofluorescence directe (Frahm *et al.*, 1994 ; Bangsborg, 1997), à la technique FISH (Fluorescence *in situ* hybridization, Desai *et al.*, 1999) et à la cryométrie en flux (Harf *et al.*, 1997 ; Riffard *et al.*, 2001) ou en phase solide (Aurell *et al.*, 2004 ; Delgado-Viscogliosi *et al.*, 2005).

II.3.8.2.2 Protistes

La réglementation des TARs n'exige pas la recherche systématique des protistes. Certaines espèces y sont pourtant régulièrement présentes sous forme planctonique et surtout dans les biofilms (El Sibae, 1993 ; Kusnetsov, 1993 ; Borella, 2005). Elles y représentent un danger sanitaire, soit par leur propre caractère infectieux (Grimm *et al.*, 2001), soit par le fait qu'elles peuvent jouer le rôle de réservoirs pour des bactéries pathogènes, légionelles ou autres bactéries (Srikanth *et al.*, 1993 ; Abd *et al.*, 2005).

Le dénombrement des protistes se fait en général après fixation au formol du biofilm remis en suspension, puis décantation en chambre d'Utermöhl (figure 22) et observation au microscope inversé. Les dénombrements peuvent également être faits sur des montages entre lame et lamelle après marquage des amibes par méthodes moléculaires (technique FISH, par exemple) ou encore par PCR quantitative (Behets *et al.*, 2007).

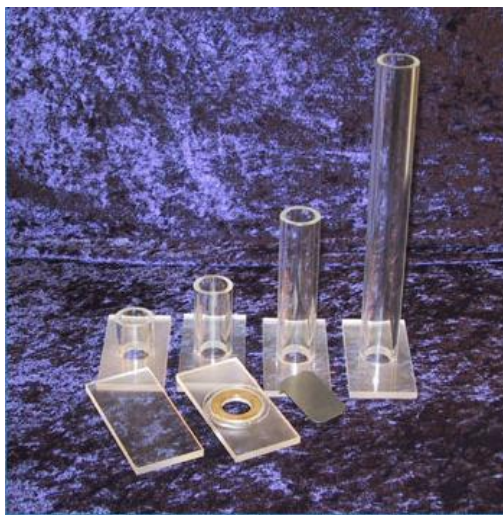


Figure 22. Chambre pour dénombrement de protistes selon Utermöhl (1958)

II.4 Solutions actuelles de traitements des biofilms appliquées aux TAR s

Le traitement des biofilms dans les installations de refroidissement ou les réseaux de distribution d'eau vise en premier lieu le contrôle de la prolifération de *Legionella pneumophila*. Dans certaines industries, ces traitements visent également le contrôle de l'entartrage biologique et la prolifération d'autres pathogènes alimentaires. L'utilisation des biocides et des désinfectants

chimiques est la principale méthode appliquée pour le traitement des biofilms indésirables dans les circuits d'eau et les installations de refroidissement. Le traitement thermique est parfois utilisé, principalement dans les réseaux de distribution d'eau dans les hôpitaux et les hôtels (Allegra *et al.*, 2011). Le traitement thermique est néanmoins inadapté à une utilisation dans les TARs.

Le principal mode d'action des biocides est la destruction des microorganismes. Néanmoins, l'architecture et la composition des biofilms représentent des barrières à cette action. L'approche alternative à l'action destructive des microorganismes consiste à agir sur le biofilm en réduisant sa croissance et en provoquant directement son détachement à partir des surfaces pour faciliter le contact entre le biocide et les cellules cibles (Chen *et al.*, 2000). Dans ce cas, l'action du produit de traitement doit être dirigée vers la destruction des différents composants de la matrice du biofilm qui jouent un rôle dans son attachement aux surfaces. Loret *et al.* (2005) ont étudié l'efficacité de certains biocides sur les composantes biologiques du biofilm mais aussi sur l'adhésion de ces composantes à des surfaces. Ils ont constaté qu'il est difficile d'avoir un biocide efficace à la fois dans son action désinfectante et sur le détachement du biofilm. Dans la majorité des cas, le traitement des TARs passe par l'utilisation de deux produits : un biocide et un anti tartre pour combiner les deux actions.

L'efficacité de la désinfection dépend de la nature du biocide et de sa concentration, des paramètres spécifiques à chaque installation sont néanmoins pris en compte dans le choix de la méthode de désinfection et de sa qualité :

- L'état de contamination initial de l'installation ;
- L'état des surfaces de l'installation et du circuit d'eau ; l'entartrage et la corrosion facilitent en effet l'adhésion des biofilms à ces surfaces ;
- La qualité d'eau d'appoint dans les cas des TARs, notamment en termes de qualité microbiologique et des concentrations des matières organiques. Les matières organiques réagissent en effet avec certains biocides oxydant, réduisent leur efficacité et produisent des sous produits de désinfection ;
- Le temps de contact entre le produit de désinfection et les microorganismes, notamment dans le cas des traitements choc où ce paramètre doit être rigoureusement respecté.

Il existe de nombreux traitements physiques, thermiques et chimiques pour détruire les bactéries ou inhiber leur développement. Nous nous intéressons dans cette partie aux traitements appliqués pour le control du risque légionelle. L'efficacité des biocides destinés au traitement des biofilms a été plus au moins caractérisée en termes de réduction du nombre d'unités formant colonies par unité de surface ou de volume. Cette efficacité a été testée sur des espèces microbiennes spécifiques, sur la biomasse totale et sur d'autres paramètres dans l'eau, sur des biofilms naturels ou reconstitués (Chen *et al.*, 2000 ; Rand *et al.*, 2007).

II.4.1 Traitements physiques

II.4.1.1 Traitement thermique

Plusieurs études ont porté sur l'efficacité du traitement thermique vis-à-vis de *L. pneumophila* dans des installations en grandeur réelle (Allegra *et al.*, 2010) ou à une échelle expérimentale (Rogers *et al.*, 1994 a ; Muraca *et al.*, 1987 ; Lin *et al.*, 1998). Rogers *et al.* (1994 a) montrent ainsi que *L. pneumophila* est capable de survie et/ou de croître à des températures de 20 à 50°C. À 60°C

aucune *L. pneumophila* cultivable n'a été détectée. Muraca *et al.* (1987) confirment ces résultats et démontrent que les légionelles sont complètement éradiquées à des températures de 50 à 60°C en moins de 3h. Lin *et al.* (1998) indiquent que le temps requis pour obtenir un abattement de 90% (1 Log) de *L. pneumophila* cultivables à 45°C, 50°C, 60°C et 70°C sont de 2500, 380, <5 et <1 min respectivement.

Toutes ces études démontrent que la température effective de désinfection doit être supérieure à 60°C. D'ailleurs, l'organisation mondiale de la santé préconise des chocs thermiques à 70°C pendant 30 min pour le contrôle de la multiplication de *L. pneumophila*. Néanmoins ces mesures ont été effectuées vis-à-vis des formes cultivables de cette bactérie. Allegra *et al.* (2010) démontrent en effet qu'un traitement thermique à 70°C pendant 30 min *in vitro* aboutit à l'entrée dans l'état VBNC de 3 souches de *L. pneumophila* et d'une souche de *L. anisa*. Les pourcentages des VBNC varient alors de 4.6 à 71 % dans le milieu.

II.4.1.2 Les ultraviolets (UV)

Les études des effets des UV (UVC) sur les bactéries ont toutes été réalisées à la longueur d'onde de 254 nm. Les lampes UV, dites aussi lampes germicides, émettent 86% de leur énergie à 254 nm, avec certaines différences selon les fabricants. Cette longueur d'onde est proche du pic d'absorption de l'ADN, ce qui rend les bactéries sensibles aux UV mais à des durées de radiation différentes selon les bactéries (figure 23) (Zimmer *et al.*, 2007).

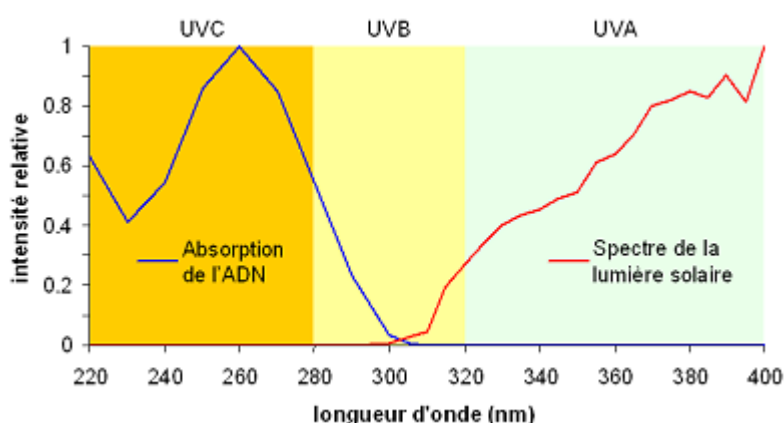


Figure 23 : Spectre d'absorption de l'ADN

Les UVC agissent par formation de dimères de thymine dans l'ADN, ce qui inhibe la réplication et la transcription de l'ADN et empêche ainsi la multiplication bactérienne (Liu *et al.*, 1995). La désinfection aux rayons UV présente un intérêt croissant et devient une alternative à la désinfection chimique notamment au chlore (Reed, 1998). Les radiation UV ont en effet un très large spectre d'activité et sont capables d'inactiver une large gamme de pathogènes. De plus, les UV, faciles à mettre en œuvre, ne produisent pas de sous-produits de désinfection (Mechsner *et al.*, 1991 ; Lazarova *et al.*, 1999).

Cependant, l'efficacité de la désinfection par les UV peut être réduite par les mécanismes de défenses des bactéries notamment la photo-réactivation et la réponse SOS (Hoyer *et al.*, 1998 ; Guo *et al.*, 2011). Ces mécanismes de réparation cellulaire, augmentent donc le risque microbien après la désinfection aux UV. Hoyer *et al.* (1998) ont étudié l'impact de la photo-réactivation sur l'efficacité d'un traitement UV vis-à-vis d'une douzaine de souches bactériennes. En présence de ce mécanisme de réparation, une énergie de 30 mJ/cm² a été nécessaire pour une réduction de 4 Log

d'*E.coli*. L'inhibition de la photo-réactivation, permet d'obtenir ce taux de réduction avec seulement 10 mJ/cm². Un résultat similaire a été retrouvé avec 16 autres bactéries.

Très peu d'études ont été consacrées aux microorganismes après la photo-réactivation. Il est important de savoir si ces microorganismes retrouvent leur état physiologique initial et leur pouvoir pathogène. Il a été rapporté que *Cryptosporidium parvum* (protozoaire) active le mécanisme de réparation cellulaire par photo-réactivation après une exposition aux UV, mais que son pouvoir pathogène diminue après ce traitement (Oguma *et al.*, 2001 ; Zimmer *et al.*, 2003). Guo *et al.* (2011) montrent que deux souches d'*E.coli* l'une résistante à l'ampicilline et l'autre fluorescente, (résistances apportées par des plasmides exogènes), retrouvent ces phénotypes après la photo-réactivation. Ils suggèrent que ce mécanisme ne modifierait pas les propriétés physiologiques chez cette bactérie. Ces deux résultats contradictoires supposent que les modifications apportées par la photoréactivation dépendent du microorganisme considéré, mais aussi du trait physiologique considéré. Le risque majeur du traitement des pathogènes par les UV est donc la modification de leur pouvoir pathogène et la possibilité d'apparition d'une résistance aux molécules antimicrobiennes suite aux mécanismes de photoréactivation (risque de mutations).

Des améliorations ont été proposées, comme la combinaison d'acide peracétique avec les UV (Martin et Gehr, 2007), ou l'application de doses assez élevées d'UV (Sommer *et al.*, 2000 ; Guo *et al.*, 2009). Shang *et al.* (2009) montrent que l'addition de 1 mg/L de dioxyde de titane (TiO₂) au cours de la désinfection par les UV inhibe les mécanismes de défense des bactéries. Cet effet inhibiteur serait lié à la formation de radicaux libres et /ou des faibles doses d'oxydants stables tel que l'H₂O₂. Djadour *et al.* (2005) ont préalablement démontré que le mécanisme d'action du TiO₂ est lié à la production des radicaux libre OH[•].

Plusieurs études enfin rapportent que l'utilisation des radiations UV pour la désinfection des installations en grandeur réelle est inefficace pour le contrôle de *Legionella* dans les TARs en raison de l'absence d'effet rémanent et de l'interférence de la lumière UV avec les particules (biofilm, dépôts, turbidité) (Kusnetsov *et al.*, 1994). Muraca *et al.* (1987) montrent néanmoins que l'irradiation continue aux UV à 30 000 µW-s/cm² permet l'abattement de 5 Log en 20 minutes d'application, au delà desquelles aucune inactivation supplémentaire n'a été observée. Il existe un contraste majeur entre les résultats obtenus à l'échelle de laboratoire et l'application des UV (seuls) à une grande échelle. Les radiations et les temps de contact appliqués à l'échelle expérimentale sont parfois inapplicables à une échelle industrielle. De ce fait, d'autres mesures, telles que l'hyperchlorination, le traitement thermique (kim *et al.*, 2002) et l'addition d'H₂O₂ (Triassi *et al.*, 2006) doivent être couplées aux UV pour un contrôle efficace du risque légionelles.

II.4.1.3 Les ultrasons

Les ultrasons à faible fréquence (20–100 kHz) sont reconnus pour leur effet bactéricide (Piyasena *et al.*, 2003). Pendant le processus de sonication, des ondes longitudinales sont générées, créant ainsi une alternance de compression et de dépression. Ces changements de pression génèrent des bulles de cavitations qui grandissent au fur et à mesure des cycles de compression et de dépression jusqu'à l'implosion. L'implosion des bulles génère alors une énergie provoquant des effets bactéricides physiques (haute température locale et changement de pression), mécaniques et chimiques (production de radicaux libres) (Ahn *et al.*, 2003 ; Joyce *et al.*, 2003).

Declerck *et al.* (2010) ont étudié l'effet des ultrasons sur des légionelles libres, mais aussi sur des amibes du genre *Acanthamoeba* sous forme de trophozoites ou de kystes, infectées ou non par des légionelles. Les principaux résultats de cette étude montrent que les kystes d'*Acanthamoeba* sont en mesure de protéger *L. pneumophila* du traitement par ultrasons. De plus la résistance des kystes vis-à-vis des ultrasons est significativement plus élevée que celle des trophozoites. Des observations similaires ont été rapportées pour divers biocides et sont expliquées par la présence de cellulose dans la paroi du kyste à double couche (Chavez-Munguia *et al.*, 2005). Garcia *et al.* (2007) ont montré que l'avantage de l'interaction entre les trophozoites d'*Acanthamoeba polyphaga* et *L. pneumophila* lors d'un traitement au chlore est réciproque. En effet la résistance de cette amibe est aussi significativement améliorée lorsqu'elle est infectée par *L. pneumophila*. De plus, ce traitement, comme pour le chlore et la chloramine, induit également l'entrée de ces bactéries à l'état VBNC au cours duquel les légionelles conservent leur virulence (Steinert *et al.*, 1997).

Malgré les performances de ce traitement et ces avantages environnementaux dus à l'absence de rejets écotoxiques, son application à une grande échelle n'est pas recommandée du fait de ses coûts énergétiques et de l'absence d'effet rémanent qui permet de prévenir la reviviscence après les traitements.

II.4.2 Traitements chimiques

II.4.2.1 Les agents oxydants

Plusieurs agents oxydants ont été largement utilisés pour la désinfection d'eau potable, des eaux de refroidissement et des piscines dont des produits halogénés tels que le chlore, le brome et l'iode et des produits non halogénés tels que le dioxyde de chlore, la chloramine, l'ozone, le peroxyde d'hydrogène et les permanganates de potassium (kim *et al.*, 2002). L'action des biocides oxydants sur les bactéries est non sélective. Ils agissent principalement par oxydation chimique des constituants cellulaires des microorganismes et provoquent ainsi l'arrêt de certaines fonctions cellulaires qui aboutissent à la mort des microorganismes.

II.4.2.1.1 Le chlore

Le chlore est le biocide oxydant le plus utilisé pour la désinfection des eaux potables, des piscines et, dans une moindre mesure, des eaux de refroidissement. Le chlore affecte en effet la respiration cellulaire, les activités de transport, et dégrade les acides nucléiques et les enzymes aboutissant à l'inactivation des microorganismes. Le chlore peut être ajouté à l'eau sous forme de chlore gazeux ou de sels d'hypochlorite (l'hypochlorite de sodium, l'hypochlorite de calcium), mais aussi par production *in situ* d'hypochlorite via l'électrolyse d'une solution saline (kim *et al.*, 2002).

Le contrôle de *L. pneumophila* nécessite un taux résiduel de chlore de 1 à 6 mg/L avec un optimum de 2 mg/L (lin *et al.*, 1998 ; Thomas *et al.*, 1999). Cette concentration doit être plus élevée lorsque les légionelles sont associées à des amibes. En effet une concentration de 4 mg/L est nécessaire pour le contrôle des *L. pneumophila* associées à l'amibe *H. vermiformis* (Kuchta *et al.*, 1993) et supérieure à 50 mg/L lorsque les *L. pneumophila* sont associées aux kystes d'*A. polyphaga* (kilvington *et al.*, 1990). L'efficacité du Cl₂ vis-à-vis de *L. pneumophila* est plus élevée à haute température (43°C Versus 25°C), mais il se dégrade plus rapidement à température élevée (kim *et al.*, 2002).

La désinfection par le chlore est néanmoins associée à 3 principaux inconvénients. En effet il est souvent associé à la formation de sous-produits de désinfection (THM, chlorophenol), à la corrosion, et à l'absence d'effet rémanent à long terme. Certaines études se sont donc orientées vers un couplage avec des biocides permettant la réduction de la concentration du Cl_2 . Rand *et al.* (2007) ont comparé l'efficacité de certaines combinaisons : Cl_2 , UV/ Cl_2 , ClO_2 et ClO_2 /UV.. L'efficacité de ces produits a été testée sur des biofilms qui se sont développés sur des coupons de polycarbonate dans des réacteurs alimentés par une eau de consommation. Ils ont montré que le traitement ClO_2 /UV a été le plus efficace sur les bactéries totales hétérotrophes en suspension et en biofilm avec des réductions de 3,93 Log et de 2,05 Log respectivement. Ils confirment aussi le fait que les biocides sont moins efficaces sur les bactéries en biofilm. Ils stipulent également que le remplacement de Cl_2 par le ClO_2 devrait minimiser la reviviscence des biofilms et réduire le rejet des sous-produits de désinfection.

Martinez *et al.* (2004) ont également testé l'efficacité du chlore couplée à l'argent (Ag) et au cuivre (Cu) à différentes concentrations sur 3 groupes bactériens en suspension et responsables de l'entartrage biologique. Pour cela, ils ont réalisé un circuit hydraulique avec deux origines d'eau : une eau provenant des boues activées d'une station d'épuration et une eau provenant d'une TAR. Leurs résultats montrent que la combinaison du chlore avec le cuivre et l'argent améliore l'action biocide sur les bactéries reléguant le fer, sur les bactéries sulfato-réductrices et sur les coliformes. Cette combinaison permet aussi de réduire considérablement la concentration en chlore et par conséquent les impacts environnementaux liés au rejet des sous produits de traitement dans l'environnement. Cette étude a néanmoins été réalisée uniquement sur des bactéries en suspension et l'efficacité de cette combinaison n'a pas été testée sur des bactéries en biofilm.

Le dioxyde de chlore (ClO_2) est un désinfectant puissant à large spectre d'activité et un oxydant performant en tant que désinfectant des systèmes de distribution à grande échelle (Volk *et al.*, 2002). Malgré ses nombreux avantages, le dioxyde de chlore représente une des sources potentielles des sous-produits inorganiques tels que les ions chlorites (ClO_2^-) et chlorates (ClO_3^-) qui, à certaines concentrations, peuvent représenter un risque pour la santé humaine (Werdehoff et Singer, 1987 ; Gordon *et al.*, 1992).

La formation de sous produits de désinfection organohalogénés tels que les trihalométhanes (THL) et les acides haloacétiques par le ClO_2 est généralement plus faible que celle obtenue par le chlore libre (Cl_2) (Hofmann *et al.*, 1999 ; Werdehoff et Singer, 1987). Ceci est principalement attribuable aux différences des mécanismes de la réaction d'oxydation. En effet, sa structure radicalaire lui permet de se comporter comme un accepteur d'électrons alors que le chlore conduit à des réactions d'addition ou de substitution avec la formation de composés chlorés. Volk *et al.* (2002) montrent que la substitution de Cl_2 par le ClO_2 pour le traitement d'un système de distribution d'eau ne dégrade pas la qualité microbiologique de l'eau et conduit à une réduction de 85% (de 30 $\mu\text{g/L}$ à 5 $\mu\text{g/L}$) des concentrations de trihalométhane et de 60% (de 20 $\mu\text{g/L}$ à 8 $\mu\text{g/L}$) des concentrations des acides haloacétiques. Le dioxyde de chlore ne réagit pas avec l'ion ammonium et les composés aminés et il est incapable d'activer la réaction haloforme, qui est la principale voie de formation de produit organohalogénés. Le pouvoir oxydant du ClO_2 permet d'éliminer le fer et le manganèse par précipitation des sels insolubles et peut dégrader les composés organiques responsables des mauvaises odeurs (Veschetti *et al.*, 2005).

L'efficacité du ClO_2 pour la désinfection des réseaux de distribution d'eau potable a été démontrée par Gagnon *et al.* (2005). Dans leur étude, ils ont simulé un réseau de distribution par des réacteurs annulaires contenant des coupons en polycarbonates et en inox supportant le développement du biofilm. L'efficacité du ClO_2 appliqué à des concentrations de 0,5 à 0,25 mg/L

était plus élevée que celle des ions chlorite (ClO_2^-) vis-à-vis des bactéries hétérotrophes du biofilm et en suspension. Ce résultat montre l'intérêt d'un résiduel de ClO_2 dans l'eau, les ions chlorates qui résultent de la dégradation du ClO_2 ne permettent pas le contrôle de la croissance des biofilms. Cependant, en comparaison avec le chlore, le dioxyde de chlore a montré une meilleure activité résiduelle, ce qui constitue un avantage dans la perspective d'une application à grande échelle (Loret *et al.*, 2005).

La performance du dioxyde de chlore vis-à-vis des virus et des bactéries est supérieure à celle du chlore libre.

Les effets toxicologiques de l'exposition au chlorite ont d'abord été associés au système hématopoïétique. A bas niveau, les ions chlorites peuvent entraîner une anémie hémolytique, par le biais des dommages oxydatifs de la membrane des globules rouges, tandis que des niveaux plus élevés peuvent entraîner une augmentation de la méthémoglobine. D'autres études ont montré que l'ion chlorite peut induire des effets sur le système nerveux chez les nourrissons et les jeunes enfants (Veschetti *et al.*, 2005).

Dans le contexte de traitement des tours aéro-réfrigérante, où les eaux de refroidissement sont déversées dans l'environnement, les dommages relatifs à ces sous produits sont liés à leurs effets sur les écosystèmes aquatiques. van Wijk *et al.* (1995 ; 1998) ont montré que les chlorites et les chlorates sont écotoxique vis-à-vis des microorganismes, des micro-algues, des invertébrées et des poissons. La dose létale (LD50) des chlorates vis-à-vis de ces organismes est respectivement de : 38 mg/L, 563 mg/L, 2442 mg/L, et 3815 mg/L. Les chlorites sont également considérés comme des composés toxiques vis-à-vis de ces organismes (van Wijk *et al.*, 1995 ; 1998). Il est donc important de minimiser les rejets des chlorites et des chlorates dans l'environnement afin de prévenir les effets de ces composés sur les écosystèmes aquatiques.

Du fait des effets toxiques de ces sous-produits et leur faible biodégradabilité, l'US EPA (Fed. Reg., 1994) a proposé de limiter la concentration maximale de dioxyde de chlore résiduel à 0,8 mg/L, et des ions chlorite à 1,0 mg/L. La mise en œuvre de cette directive a débuté en 1998. L'une des perspective pour la réduction des rejets de chlorites et de chlorates dans l'environnement et de réduire la concentration de ClO_2 dans les opérations de désinfection.

II.4.2.1.2 La chloramine

La monochloramine (NH_2Cl) est la chloramine minérale la plus utilisée pour la désinfection de l'eau. Son utilisation a été généralisée notamment pour remplacer le chlore produisant trop de sous-produits de désinfection. La monochloramine présente l'avantage d'être plus stable que le chlore, mais est néanmoins moins efficace et nécessite donc des concentrations plus élevées.

Turetgen (2004) a comparé l'efficacité de la monochloramine et du chlore vis-à-vis des biofilms dans des TARs. L'étude a été réalisée simultanément *in situ* dans les TARs et sur un pilote de laboratoire dans lequel il a reproduit les conditions retrouvées dans les TARs. Les biofilms développés sur des coupons en acier inoxydable pendant une durée de 30 jours ont été soumis à différentes concentrations de biocides. En se basant sur les concentrations des bactéries hétérotrophes, il a constaté que la monochloramine est plus efficace que le chlore pour le contrôle du développement du biofilm à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industriel. LeChevallier *et al.* (1988) et Samrakandi *et al.* (1997) aboutissent également à la conclusion que la monochloramine permet une meilleure inactivation des biofilms que le chlore. Ils ont expliqué ce résultat par le fait que la monochloramine diffuse mieux dans les biofilms et que la capacité de pénétration compense la faible activité de désinfection de la monochloramine par rapport au chlore constatée contre des

bactéries en suspension. L'efficacité de la monochloramine a également été prouvée pour le traitement des réseaux d'eaux de consommation (Kool *et al.*, 1999).

Enfin, Sanli-Yurudu *et al.* (2007) ont testé l'efficacité du Chloramine T trihydrate sur plusieurs souches de *L. pneumophila* à l'état libre et à l'état sessile. Ce biocide s'est avéré efficace aux concentrations recommandées par son fournisseur (0,1-0,3%) sur les bactéries libres. Des concentrations plus élevées ont été nécessaires pour que ce biocide soit efficace sur les légionelles sessiles. La monochloramine est également reconnue comme inductrice de l'entrée des légionelles dans l'état VBNC.

II.4.2.1.3 L'ozone

L'ozone est un désinfectant à large spectre qui agit principalement sur l'ADN des microorganismes. Il est largement utilisé en Europe pour la désinfection d'eau potable comme une alternative au chlore notamment pour minimiser les sous-produits de désinfection. Aux USA il est également utilisé pour le traitement des TARs. Aux Etats Unis d'Amérique, plus d'une centaine de TARs sont traitées à l'ozone aux USA. L'ozone a un très faible effet rémanent, et de ce fait, il est souvent couplé au chlore.

Viera *et al.* (1999) ont étudié l'efficacité de l'ozone dissous vis à vis de *P. fluorescens* à l'état planctonique et en biofilms. *P. fluorescens* est souvent associé aux systèmes de refroidissement. Cette étude montre que 0,1 et 0,3 ppm et un temps de contact de 10 et 30 min respectivement, permettent d'obtenir un taux d'élimination de 99% (10^7 - 10^8 UFC) de *P. fluorescens* planctoniques. Par contre, l'ozone dissous s'avère moins efficace vis-à-vis des bactéries en biofilm. En effet, à 0,15 ppm, l'ozone réduit les concentrations de *P. fluorescens* sessiles d'un facteur de 2 à 3 uniquement. D'autres études ont également rapporté son efficacité sur *L. pneumophila* et *E. coli* en suspension. Domingue *et al.* (1988) montrent que l'ozone est plus efficace que le peroxyde d'hydrogène et le chlore vis-à-vis de *L. pneumophila* planctoniques. En effet à 0,1 à 0,3 mg/L, l'ozone permet d'obtenir un taux de mortalité de 99% en 5 min d'exposition alors que des concentrations de 0,3 ppm de chlore et 1 g/L d' H_2O_2 et un temps de contact de 30 minutes sont nécessaires pour obtenir le même taux de mortalité de *L. pneumophila* (Domingue *et al.*, 1988).

McGrane *et al.* (1995) ont également testé l'efficacité de l'ozone dans un modèle expérimental de TAR. Ces résultats corroborent les résultats précédents ; en effet, l'efficacité de l'ozone à 0,1 mg/L est supérieure à celle du chlore à 1 mg/L. Thomas *et al.* (1999) montrent qu'il est possible de diminuer les concentrations de *L. pneumophila* et de contrôler sa croissance à l'aide d'un traitement continu à l'ozone à des concentrations résiduelles de 0,1 à 0,54 mg/L. Comme nous l'avons déjà signalé, l'ozone ne possède pas d'effet rémanent, d'où la nécessité de maintenir un résiduel d'ozone pour assurer un meilleur contrôle de *L. pneumophila* (Thomas *et al.*, 1999).

II.4.2.1.4 Le Peroxyde d'hydrogène

L' H_2O_2 n'est pas souvent utilisé dans le traitement des eaux ; il est utilisé principalement comme antiseptique et désinfectant des surfaces. L' H_2O_2 agit principalement par l'oxydation des composants cellulaires des bactéries. La décomposition de l' H_2O_2 aboutit à la formation des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui sont principalement le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Ce sont les radicaux OH^{\cdot} qui sont les plus réactifs et ont une grande capacité à produire des dommages cellulaires (Labas *et al.*, 2008).

Ces radicaux peuvent en effet endommager les acides nucléiques, les enzymes et les constituants membranaires des cellules bactériennes. L'ADN est une cible potentielle des radicaux

hydroxyles, qui attaquent à la fois les bases et les sucres. Cette réaction aboutit entre autre à la rupture des chaînes simples et double brin de l'ADN aboutissant à l'inhibition de la réplication (Cabiscol *et al.*, 2000, Sies *et al.*, 1992 ; 1993). De même, les protéines et les acides aminés constitutifs sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. Lorsque les protéines possèdent une activité enzymatique, celle-ci est susceptible d'être altérées. Fucci *et al.* (1983) décrivent dans leur étude l'inhibition de la glutamine synthétase par les radicaux hydroxyles, cette inhibition est levée par l'ajout de la catalase et de l'EDTA.

Les lipides peuvent également être endommagés par le radical hydroxyle qui réagit avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique. Le premier effet de la peroxydation des lipides est une diminution de la fluidité membranaire altérant ainsi les propriétés et les protéines membranaires (Cabiscol *et al.* 2000).

L'atteinte de l'ensemble de ces constituants cellulaires aboutit à l'altération de leurs fonctions et aboutit à un effet bactériostatique ou biocide selon le degré d'altération et les mécanismes de réparation.

C'est La catalyse de l' H_2O_2 en radicaux hydroxyle qui semble augmenter son effet pour produire un effet significatif (Labas *et al.*, 2008). A faibles concentrations (<25 mg/L) le peroxyde d'hydrogène ne semble pas avoir d'effet significatif vis-à-vis d'*E.coli* ni de *L. pneumophila*. Labas *et al.* (2008) montrent que le temps de contact nécessaire pour avoir un effet significatif est relativement long.

Le peroxyde d'hydrogène à l'avantage d'être non toxique, inoffensif, sans rejets écotoxiques et il présente un effet rémanent. Le traitement à l' H_2O_2 nécessite cependant de très fortes concentrations pour avoir des effets significatifs. L'accélération de sa décomposition, et donc la production des radicaux réactifs par une catalyse aux UV par exemple, peut néanmoins présenter une alternative à l'utilisation de l' H_2O_2 seul ou d'autres biocides écotoxiques.

La photolyse de l' H_2O_2 par les UV est un processus rapide, souvent utilisé pour l'élimination des matières organiques. Les radicaux libres ainsi générés réagissent avec les composés organiques d'une manière non sélective. Le potentiel redox des radicaux hydroxyles leur confère la capacité d'oxyder entièrement les molécules organiques jusqu'au dioxyde de carbone (CO_2). L'oxydation de la matière organique est plus efficace dans le cas de molécule de faible poids moléculaire. L'élimination préalable de molécule de poids moléculaire élevé par des prétraitements tels que l'ultrafiltration, favorise l'oxydation totale de la matière organique par le couple H_2O_2 /UV jusqu'à la minéralisation (Metz *et al.*, 2011). A contrario, la présence de molécules de poids moléculaire élevé aboutit à une dégradation partielle et à la production de molécule de faible poids moléculaire, hydrolysable par les bactéries. Metz *et al.* (2011) ont montré que l'effet d'un traitement H_2O_2 /UV à 10 ppm d' H_2O_2 et à 3,7 KW d'UV sur la concentration du COA dépend de la concentration initiale du COT et des prétraitements subis par ces échantillons.

L'efficacité de ce procédé dépend principalement de la vitesse de formation des radicaux hydroxyles mais aussi de la vitesse de leur disparition qui est liée à la présence de chélateurs, à la température, à la concentration et à la nature de la matière organique (Metz *et al.*, 2011).

II.4.2.2 Biocides non oxydants

Les biocides non oxydants ont généralement un mode d'action sélectif vis-à-vis des bactéries. Pour cette raison il est recommandé d'alterner deux biocides non oxydants avec un mode de traitement en choc. Ce mode d'utilisation permet d'éviter que des résistances à ces biocides se

développent dans les circuits traités. Ces biocides sont caractérisés par l'avantage d'avoir un faible pouvoir corrosif.

Parmi ces biocides, on retrouve le DBNPA, dont l'utilisation est généralisée en France, en alternance avec l'isothiazolone. Le DBNPA (2,2-dibromo-3-nitro-propionoamide) est un amide halogéné, plus efficace que l'isothiazolone, mais moins efficace que le chlore ou le dioxyde de chlore vis-à-vis des *L. pneumophila* planctoniques. Gao *et al.* (2001) montrent que 15 mg/L et 32 h de contact sont nécessaires pour obtenir une réduction de 4 Log de *L. pneumophila* planctonique ou sessiles. L'application d'une concentration résiduelle de 1 mg/L en continu permet également d'obtenir un résultat similaire. Le DBNPA est néanmoins biodégradable et pourrait donc constituer une source de nutriments pour les microorganismes, ce qui favoriserait la reviviscence, notamment après les traitements choc (Skaliy *et al.*, 1980).

Les isothiazolones sont des cétones hétérocycliques, qui altèrent la structure tridimensionnelle des protéines (dont des enzymes) en réagissant avec quelques acides aminés tels que la cystéine et des tripeptides tels que le glutathion. Ils altèrent donc les fonctions enzymatiques et par conséquent le métabolisme microbien. Leur action nécessite un temps de contact assez long (plusieurs heures). Les principales isothiazolones possédant une activité antibactérienne, utilisés pour le traitement des eaux de refroidissement sont : le 5-chloro-N-methylisothiazolone (CMIT), le N-methylisothiazolone (MIT) et le benzisothiazolone (BIT) (Collier *et al.*, 1991). Ils possèdent un large spectre d'activité et leur effet vis-à-vis des légionelles a fait l'objet de plusieurs études. McCoy *et al.* (1986) ont observé un abattement de 4 à 9 Log avec quelques mg/L de biocide en une journée et en utilisant des échantillons d'eau de refroidissement filtrée à 0,45 mm inoculés avec les bactéries. Thomas *et al.* (1999) ont également démontré des résultats similaires néanmoins ces auteurs ont montré une efficacité plus faible du biocide lors de son application sur un système de refroidissement, dans ces conditions de traitement ils observent moins de 2 Log de réduction à 8 mg/L sur 12 heures. Parmi les thiazolones, le CMIT est plus efficace que le BIT pour l'élimination de *L. pneumophila* (Barker *et al.*, 1992). Ces thiazolones sont aussi moins efficaces que d'autres biocides oxydants ou non oxydants comme le glutaraldéhyde, le 2,2-dibromo-3-nitropropionamide (DBNPA), le chlore, le chlorure didecyltriméthylammonium et nécessitent des temps d'action et des concentrations assez élevés pour obtenir des abattements significatifs (Skaliy *et al.*, 1980 ; Barker *et al.*, 1992).

Il existe d'autres biocides non oxydants tels que les amines, et les aldéhydes, ces biocides nécessitent également une application à forte dose et avec un temps d'application assez élevé pour obtenir des résultats significatifs notamment vis-à-vis de *L. pneumophila* (Kim *et al.*, 2002).

II.4.3 Effet des biocides vis-à-vis des amibes associées à *L. pneumophila*

Peu d'études ont été effectuées sur l'efficacité des biocides sur les amibes. Néanmoins l'efficacité des formes du chlore générées par électro-chloration a été prouvée pour plusieurs protozoaires (Venczel *et al.*, 1997). Loret *et al.* (2005) rapportent dans leur étude comparative sur l'efficacité de certains biocides (Cl_2 , NH_2Cl , ClO_2 , Cu/Ag et l'O_2) que mis à part le Cu/Ag et la monochloramine, les autres biocides réduisent significativement la concentration des amibes planctoniques. Néanmoins, aucun traitement ne semble permettre d'éliminer entièrement les amibes dans les réseaux.

Dans une étude récente, Loret et Greub (2010) montrent que les amibes libres résistent aux traitements qui sont appliqués aux eaux de consommation. De plus, lorsque les traitements sont

interrompus, les légionelles se multiplient à nouveau très rapidement ce qui laisse supposer la persistance de leur hôte (Thomas *et al.*, 2004).

Il a aussi été montré que des amibes provenant de systèmes de TAR exposées à des traitements non oxydants développent des résistances accrues aux désinfectants (Srikanth et Berk, 1993). La destruction simultanée des amibes, sous forme trophozoïtes et sous forme de kystes, ainsi que des légionelles est possible après un traitement thermique à 60°C pendant 30°C. Ce traitement est souvent utilisé par les stations thermales, et est encore plus efficace lorsqu'il est associé à 2-3 mg de résidu chloré par litre (Kuchta *et al.*, 1993).

Les amibes sont capables de s'enkyster sous l'effet d'un stress dû à une carence alimentaire ou à un traitement biocide. Or, *L. pneumophila* est capable de survivre à l'intérieur des kystes d'*Acanthamoeba polyphaga* après une exposition à 50 mg/l de chlore libre, ce qui peut expliquer les cas de résistance extrême qui ont parfois été enregistrés (Kilvington et Price, 1990). Les kystes d'*A. polyphaga* permettent également de protéger les légionelles d'un traitement ultrason (Declerck *et al.*, 2010).

Cependant, malgré cette relation entre les légionelles et les amibes, la présence d'amibes n'est pas systématiquement associée à la recolonisation des légionelles après désinfection car il est possible d'observer une nouvelle prolifération des amibes dans l'eau sans enregistrer de croissance rapide des légionelles.

II.4.4 Reviviscence bactérienne

La reviviscence bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau et les systèmes de refroidissement pourrait entraîner une baisse de la qualité microbiologique et organoleptique de l'eau. Malgré l'efficacité d'un certain nombre de traitements biocides vis-à-vis des microorganismes en suspension, ces derniers croissent, dans certains cas, notamment en cas d'interruption des traitements, et constituent de nouveau un risque biologique. Ces risques biologiques sont liés à la consommation d'eau contaminée par des microorganismes pathogènes et à l'inhalation d'aérosols générés par les systèmes de refroidissement et contaminés par des légionelles.

La reviviscence des bactéries après les traitements des eaux peut être due à plusieurs facteurs :

- la présence de biofilms sur les surfaces des canalisations et des installations de refroidissement ;
- l'efficacité des biocides est souvent évaluée vis-à-vis des bactéries en suspension et ne prend pas en compte les bactéries attachées aux surfaces (biofilms) ;
- les mesures d'efficacité des biocides sont souvent culture-dépendantes alors que la majorité des bactéries environnementales ne sont pas cultivables dans les conditions de laboratoire ou perdent leur cultivabilité sans pour autant perdre leur viabilité (VBNC).

La présence de matières organiques biodégradables est également un facteur influençant la croissance et la reviviscence bactérienne. Elle constitue en effet la source de nutriments pour les microorganismes. Plusieurs études ont démontré la présence de liens étroits entre la concentration de la matière organique biodégradable dans les réseaux de distribution d'eau et la reviviscence bactérienne (Le Chevallier *et al.*, 1987 ; 1993 ; Huck, 1990 ; Van der Kooij *et al.*, 1982). La détermination des concentrations de matière organique biodégradable est donc d'une importance majeure. Servais *et al.* (1993) proposent ce paramètre comme indicateur de la stabilité biologique des eaux.

L'élimination de la matière organique constitue donc un effet « bénéfique » de certains traitements biocides et pourrait augmenter leur efficacité vis-à-vis de la reviviscence bactérienne

(Ribas *et al.*, 1994). Il est donc opportun de considérer ce paramètre, en plus des paramètres conventionnels, dans la mise au point de traitements biocides destinés à limiter les risques biologiques dans les réseaux de distribution d'eau, les systèmes de refroidissement et les spas.

Il est donc important de prendre en compte tous ces paramètres qui peuvent générer des biais dans l'estimation de l'efficacité des biocides et par conséquent le choix d'un biocide pour le traitement du risque Legionella. Compte tenu de ces connaissances, la prise en compte des biofilms mais aussi des amibes est donc plus que nécessaire pour une meilleure maîtrise du risque sanitaire lié à Legionella, à la reviviscence des biofilms et à la réapparition des légionelles dans les installations même après des mesures de traitement curatives.

II.5 Objectifs

L'objectif de ma thèse est principalement de mettre au point et d'optimiser l'application de deux traitements biocides : le couple H_2O_2/UV et le ClO_2 , pour la maîtrise de la prolifération des légionelles dans les TARs. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du projet collaboratif 'Legiosecure' réunissant plusieurs partenaires scientifiques et industriels. Cette collaboration a été mise en œuvre pour la prise en compte de tous les aspects relatifs au traitement des TARs : biologiques, chimiques et énergétiques. Pour ma part, je me suis principalement intéressé au volet biologique, notamment à l'étude des effets de ces deux biocides sur les communautés microbiologiques fixées des TARs.

Le ClO_2 est un procédé de traitement très largement utilisé notamment pour le traitement des eaux des TARs et les circuits de distribution d'eau dans les hôpitaux. Notre objectif est donc de rationaliser les quantités de ClO_2 habituellement injectées pour minimiser les rejets de chlorites et de chlorates tout en conservant une performance optimale pour le contrôle de la prolifération des légionelles.

L' H_2O_2/UV est un procédé qui est utilisé pour ses capacités d'oxydation avancée de la matière organique. Il est rarement utilisé pour son pouvoir désinfectant proprement dit et à ce jour aucune TAR en France n'est traitée par ce procédé, ni par l' H_2O_2 seul d'ailleurs. Notre objectif est donc d'optimiser ce procédé pour le contrôle de la prolifération des légionelles dans les TARs. Nous nous intéressons également à ses effets sur la matière organique d'un point de vue quantitatif et qualitatif.

L'étude du procédé H_2O_2/UV a été effectuée dans un premier temps à l'échelle expérimentale. Les résultats de cette étude ont par la suite été extrapolés à une échelle en grandeur réelle pour la validation de ce procédé de traitement. Quand au ClO_2 , son étude a commencé directement sur des sites en grandeur réelle. L'étude expérimentale a été réalisée dans le but d'optimiser les conditions d'application du ClO_2 afin de réduire des quantités injectées tout en conservant une efficacité optimale.

L'étude des effets de ces deux procédés a été réalisée vis-à-vis des communautés microbiennes fixées (biofilms) et, dans certains cas, planctoniques avec un intérêt particulier porté aux légionelles et aux amibes.

Nous nous sommes également intéressés à l'étude des populations de légionelles d'une source thermale d'Aix-les-Bains en l'occurrence la source 'Soufre', naturellement contaminée par cette bactérie. Cette source est en effet utilisée comme source de biofilms pour l'ensemble de nos études expérimentales. L'étude a été basée sur un isolement des légionelles à partir des biofilms qui se développent dans cette source et sur une caractérisation phénotypique, physiologique et moléculaire de ces souches, notamment en termes de diversité et de virulence. Nous avons également étudié l'effet des traitements biocides sur leur viabilité et sur leur virulence.

III- Matériels et méthodes

III | Chapitre III : Matériels et méthodes

III.1 Intégration de l'analyse des biofilms dans l'étude des effets des biocides sur les communautés microbiennes

La prise de conscience du rôle des biofilms dans la protection des microorganismes vis-à-vis des biocides a permis leur l'intégration dans l'évaluation des capacités de désinfection des biocides. Cette intégration prend de l'ampleur dans les laboratoires de recherche mais le suivi réglementaire des installations de refroidissement s'appuie toujours sur l'analyse des communautés microbiennes planctoniques en utilisant surtout des méthodes d'analyses microbiologiques culture-dépendantes.

Dans notre étude, nous nous intéressons à l'effet des traitements biocides principalement vis-à-vis des biofilms. La prise en compte des biofilms dans les mesures de performance de ces procédés permet de définir les modalités d'applications nécessaires pour leur traitement. Elle permet également de s'affranchir des contrastes soulevés dans la bibliographie et qui concerne la résistance des biofilms à l'action des biocides. Nous nous intéressons également aux effets des biocides sur les protistes dont certains constituent un réservoir protecteur de *L. pneumophila*.

La réticence vis-à-vis de la prise en compte des biofilms dans le suivi microbiologique des installations de refroidissement est souvent justifiée par les lourdeurs opérationnelles qu'implique cette prise en compte. C'est principalement l'échantillonnage des biofilms qui, à ce jour, demeure le principal obstacle, en effet les méthodes d'analyse sont identiques à celles utilisées pour l'eau du fait que le biofilm est remis en suspension. Il est important donc de simplifier le suivi des biofilms dans ces installations. Cette simplification passe par des modalités d'échantillonnages simples et rapides.

III.2 Etudes des effets des traitements biocides vis-à-vis des communautés microbiennes planctoniques et fixées dans des conditions expérimentales

III.2.1 Choix du modèle et origine des biofilms

L'étude des effets des biocides (ClO_2 et $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$) a été effectuée sur des biofilms environnementaux d'une composition inconnue mais qui sont naturellement contaminés par des légionelles. Certaines études ont été effectuées sur des biofilms reconstitués au laboratoire mono-ou multi-espèces. La diversité microbienne de ces biofilms est donc très faible voire nulle pour les biofilms mono-espèce. Or, la diversité microbienne est également un facteur prépondérant dans le comportement des biofilms vis-à-vis de l'action des biocides particulièrement par :

- les interactions microbiennes notamment entre des amibes et les légionelles ;
- la coopération métabolique qui pourrait participer à la dégradation des drogues antimicrobiennes par des schémas métaboliques appartenant à des espèces différentes ;
- l'utilisation des propriétés métaboliques de certaines espèces pour se protéger de l'action de certains biocides. L'exemple type à ce sujet est le rôle de la catalase produite uniquement par certaines bactéries mais qui protège l'ensemble des communautés microbiennes du biofilm de l'action de l' H_2O_2 . L'autre exemple concerne les EPS qui

minimisent la diffusion des biocides et qui sont bénéfiques à toutes les communautés microbiennes du biofilm.

De plus, dans les études incluant des biofilms reconstitués, les légionelles et les amibes associées à ces biofilms (mais aussi les autres espèces constitutives) sont des souches de laboratoire. Ces souches sont en effet non représentatives des espèces environnementales en terme de diversité, mais aussi en terme de comportement vis-à-vis des biocides.

Pour toutes ces raisons, les biofilms utilisés dans nos études proviennent d'une source thermale naturellement contaminée par des légionelles et des protozoaires. Cette source est un écosystème particulier caractérisé par une température plus ou moins stable de 33.6°C à 36.6°C avec une médiane de 35°C. Le pH de cette source est proche de la neutralité. Cette source est réactive aux évènements environnementaux tels que la pluviométrie mais les fluctuations sont moins importantes que celle observées dans les cours d'eau de surface. L'hydrodynamique est également très faible ce qui favorise l'attachement et le développement des biofilms sur les surfaces disponibles.

Ces conditions permettent un développement de biofilms très rapide et à des concentrations globales suffisamment élevées pour la mise en évidence d'éventuels effets des biocides. D'ailleurs le laboratoire CARTEL a déjà utilisé cette source comme incubateur de biofilms pour d'autres études. Mon étude a donc largement bénéficié de cette expertise pour la mise au point de la démarche expérimentale (notamment le choix des supports artificiels) adoptée pour l'étude des biocides.

III.2.2 Démarche expérimentale

La démarche expérimentale adoptée pour l'étude des effets des traitements biocides dans des conditions expérimentales se compose de 3 étapes communes pour les deux traitements et une 4^{ème} étape spécifique au traitement ClO₂. La première étape consiste à incuber les lames de verre vierges (neuves) dans la source 'S' pendant une durée suffisamment longue afin que les concentrations des biofilms permettent de mettre en évidence les effets éventuels des traitements appliqués. La deuxième étape consiste à transporter les lames de verre colonisées par les biofilms dans le laboratoire, à les déposer dans des réacteurs biologiques pour subir une période d'acclimatation. La troisième étape consiste à appliquer les différents traitements et à mesurer leur effet vis-à-vis des différents constituants du biofilms. La quatrième étape, spécifique au traitement ClO₂, consiste à mesurer l'évolution des différents indicateurs du biofilm après l'arrêt des traitements.

Les traitements appliqués seront désignés dans les paragraphes suivants par Perox dans le cas des essais à l'H₂O₂/UV, aux UV et à l'H₂O₂ seul, et Securox pour les traitements au ClO₂.

III.2.2.1 Développement des biofilms

Des lames de verre stériles ont été placées sur deux supports en PVC à raison de 30 lames par support. Ces supports sont ensuite immergés dans une source thermale d'Aix-les-Bains en l'occurrence la source « Soufre » (S) pour une durée de 10 ou 15 jours selon les essais à réaliser (figure 24). Cette source qui sert d'incubateur de biofilms est une source chaude soufrée, naturellement contaminée par des légionelles et caractérisée par une température d'eau plus ou moins stable (35°C). Les concentrations du carbone organique dissous (COD) et du carbone organique totale (COT) dans la source « Soufre » sont de 0,48±0,04 mg/L et de 0,69 ±0,05 mg/L

respectivement (données de laboratoire). Les principaux critères de choix de cette source sont, d'un côté, sa contamination chronique par des légionelles (objet de notre étude), et, sa stabilité relative permettant d'éviter des variations saisonnières des biofilms sous l'influence des facteurs environnementaux.

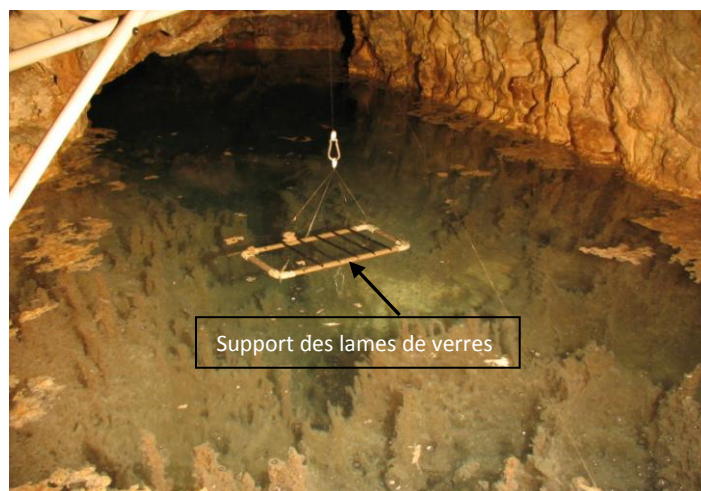


Figure 24 : Source 'Soufre' d'Aix Les Bains, les lames de verres sont placées dans un support en PVC puis immergées dans l'eau de la source. Elles sont incubées pendant 15 jours (essais PEROX) ou 10 jours (essais SECUROX), puis transportées au laboratoire dans des glacières sous une atmosphère humide obtenue par le dépôt d'eau de la source (35°C environ) au fond de la glacière.

Après la durée d'incubation, les supports sont transférés au laboratoire dans des conditions d'humidité adéquates pour la conservation des biofilms pendant le trajet. Les lames sont ensuite transférées dans des réacteurs biologiques pour les études envisagées.

III.2.2.2 Pilote expérimental

L'installation expérimentale utilisée pour les études de laboratoire a été conçue pour mimer les conditions de recirculation d'eau dans les tours aéro-réfrigérante. Elle est composée de réacteurs biologiques, de réservoirs d'eau, de pompes centrifuges. Dans le cas des essais PEROX cette installation est reliée à un réacteur UV (Bio UV), et d'une pompe doseuse pour la distribution des biocides aux concentrations voulues. Dans le cas des essais Securox elle est reliée à un automate qui règle l'injection du ClO_2 suivant les modalités (discontinue/continue) et les concentrations souhaitées.

III.2.2.2.1 Les réacteurs biologiques

Les réacteurs biologiques (figure 25) sont répartis sur des bancs comportant chacun 3 réacteurs : un banc pour les essais de référence et un banc pour les essais de traitement Perox et deux bancs pour les essais de traitement Securox. Ils comportent chacun :

- Un carrousel qui sert de support vertical pour les coupons (lames de verre) colonisés par les biofilms ;
- Une poulie d'entraînement qui est reliée à un moteur et permet ainsi la rotation du carrousel à une vitesse constante assurant entre autre l'homogénéisation de la phase aqueuse dans les réacteurs. cette vitesse a été maintenue à 21 ± 1 tour/min ;
- Une entrée et une sortie d'eau qui relie les réacteurs à un réservoir d'eau pour assurer le renouvellement de l'eau à l'intérieur des réacteurs.

La recirculation de l'eau entre le réservoir d'eau et les réacteurs est assurée par une pompe centrifuge, l'eau se déverse ensuite de nouveau dans le réservoir par un trop plein. Le débit de la recirculation est régulé par un rotamètre.

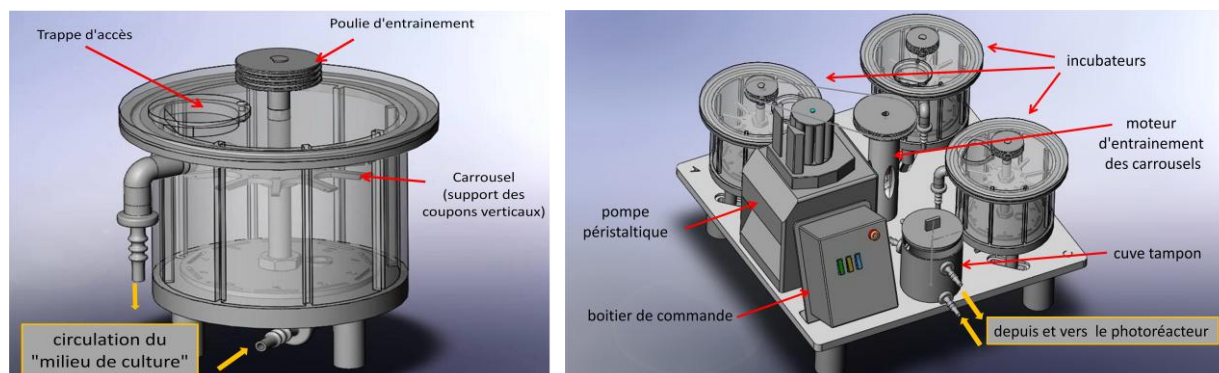


Figure 25 : Schéma d'un incubateur biologique (A) et d'un banc de 3 réacteurs biologiques (B)

III.2.2.2 Les réservoirs d'eau

Des récipients en PVC d'une capacité de 100 litres chacun sont utilisés comme réservoirs d'eau. Chaque réservoir est relié à un banc de réacteur : le banc de réacteurs destiné à l'incubation des biofilms non traités (banc de référence) et le (ou les) banc (s) de réacteurs destinés à l'incubation des biofilms traités (bancs essais). La recirculation de l'eau entre le réservoir et les réacteurs est assurée par une pompe centrifuge qui permet d'alimenter les réacteurs en eau. Le débit de renouvellement de l'eau dans les réacteurs est régulé par un rotamètre placé en aval de la pompe.

III.2.3 Particularité des traitements PEROX

III.2.3.1 Le réacteur UV (Bio-UV)

La partie de l'installation prévue pour les essais expérimentaux est reliée à un réacteur UV au niveau du réservoir. Ce réacteur fabriqué par la société Bio UV a un volume de 2.3 litres et contient une lampe UV d'une capacité énergétique de 60 mJ/cm^2 et qui émet la lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 254 nm. Le réacteur UV est relié au réservoir de façon à former une boucle de recirculation de l'eau entre le réservoir et le réacteur UV. L'eau circule dans cette boucle à l'aide d'une pompe centrifuge avec un débit de 500 L/h.

III.2.3.2 Schéma récapitulatif de l'installation expérimentale des essais PEROX

Le dispositif expérimental comporte deux parties, une partie « référence », et une partie « essai ». Chaque partie est constituée de :

- un banc comportant 3 réacteurs ;
- chaque banc est relié à un réservoir d'eau de 100 litres ;
- une pompe centrifuge assurant la circulation de l'eau entre le réservoir et les réacteurs
- la partie « essai » est relié à un réacteur UV et une pompe doseuse permettant de délivrer l' H_2O_2 . Une pompe centrifuge assure le passage de l'eau de recirculation dans le réacteur UV.

La figure 26 et la figure 27 représentent, respectivement, un schéma récapitulatif de l'installation expérimentale et son aspect réel.

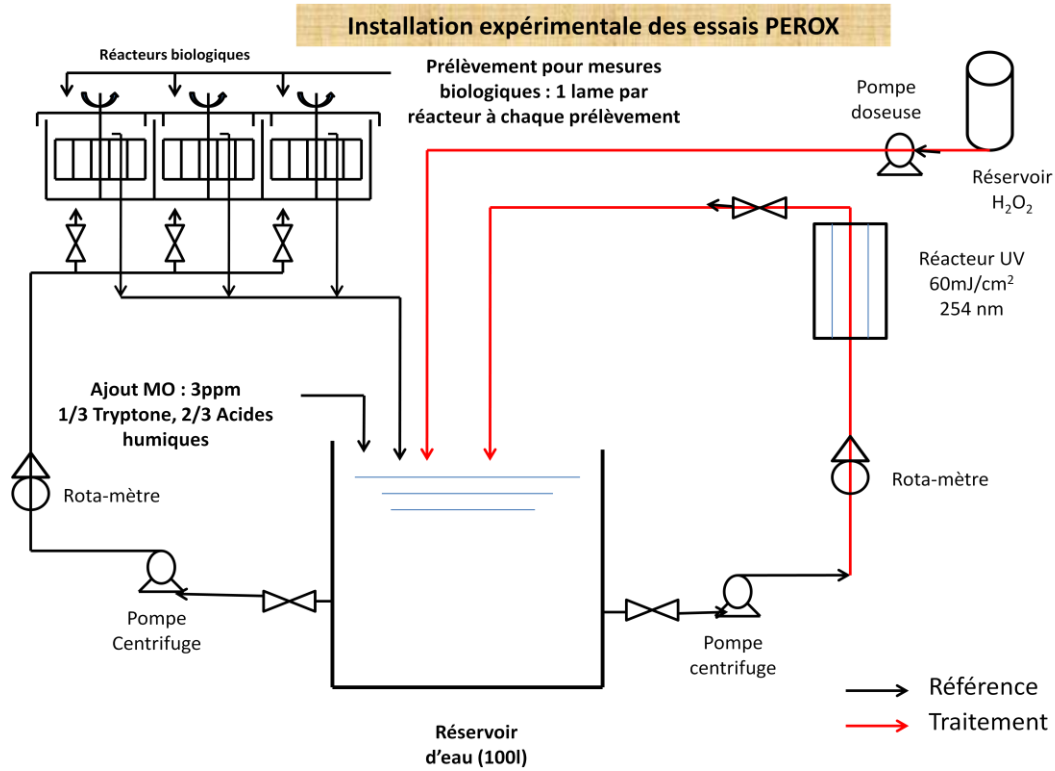


Figure 26 : Schéma du dispositif expérimental des essais PEROX

Référence

Traitement

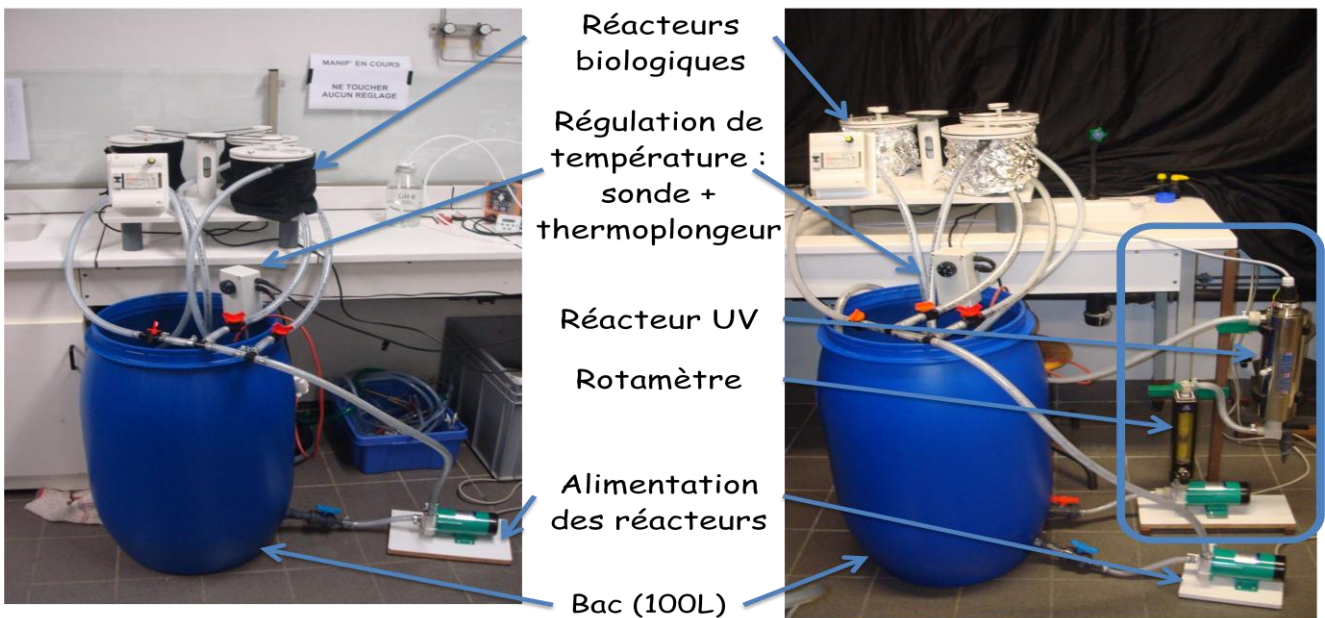


Figure 27 : Photos de l'installation expérimentale utilisée pour les essais PEROX

III.2.3.3 Adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire

En préalable de l'application des traitements Perox, une étude d'adaptation des biofilms a été effectuée. En effet la mesure de l'efficacité des procédés de traitements nécessite une certaine stabilité du biofilm. Le transfert des biofilms de leur habitat naturel à des conditions artificielles pourrait être à l'origine d'un changement de la composition et de la charge microbologique et organique du biofilm. L'objectif de cette expérimentation préalable est donc d'étudier l'évolution des principaux paramètres biologiques du biofilm après leur transfert dans les réacteurs biologiques. Cette expérimentation nous permet de déterminer le délai d'apparition de la phase de stabilisation des biofilms. C'est à partir de cette phase de stabilisation que les traitements sont appliqués. Ainsi, la stabilisation des biofilms minimise l'évolution des concentrations des paramètres biologiques qui serait due aux conditions dans lesquelles les biofilms sont incubés. Pour assurer cette expérimentation, nous avons, dans un premier temps, défini les conditions de laboratoire dans lesquelles les traitements sont appliqués.

III.2.3.3.1 Composition chimique de l'eau de recirculation

Un des objectifs de l'expérimentation est, entre autre, de définir une composition chimique de l'eau de recirculation permettant la stabilité des biofilms dans les conditions de laboratoire. L'eau utilisée provient du réseau de distribution d'eau potable du Bourget du Lac. Cette eau a été dans un premier temps filtrée sur charbon actif (filtre Brita) pour éliminer les résidus des produits de désinfection, notamment le chlore.

Afin que le facteur trophique ne devienne pas limitant dans les conditions de laboratoire, l'eau de recirculation a été supplémentée d'une source de carbone. Deux essais ont été réalisés pour tester les effets de la composition et de la concentration de la matière organique ajoutée sur l'évolution des biofilms. L'eau de recirculation a été supplémentée de tryptone (Sigma Aldrich, France) à 5 ppm de COD lors du premier essai et d'un mélange de 1/3 de tryptone et de 2/3 d'acide humiques (Sigma Aldrich, France) à une concentration de 3 ppm de COD total lors du deuxième essai. Ce mélange ainsi que la concentration de 3 ppm permettent de reproduire une partie des conditions naturelles dans lesquelles cependant, la composition et la concentration de la matière organique sont très variables. Ce paramètre reproduit en partie certaines conditions des eaux de rivières utilisées comme source d'eau de refroidissement dans les TARs de grande capacité. Cette concentration a été maintenue dans les circuits de l'expérimentation par des ajouts réguliers (tous les 48 h) de matière organique dans les mêmes proportions de tryptone et d'acides humiques. Les quantités ajoutées ont été calculées par mesure de COD résiduel avant l'ajout.

$$COD \text{ ajouté (ppm)} = 3 \text{ ppm} - COD \text{ résiduel (ppm)}$$

III.2.3.3.2 Etude de l'adaptation des biofilms après leur transfert dans les conditions de laboratoire

Des supports de lames ont été immergés dans la source 'Soufre' comme décrit ci dessus. Après 15 jours d'incubation, les lames ont été transférées dans les réacteurs biologiques. L'eau de recirculation a été reconstituée en ajoutant un mélange de matière organique contenant 1/3 de tryptone et 2/3 d'acides humiques. La concentration finale de cette eau est de 3 ppm en carbone organique dissous. Les mesures biologiques ont été réalisées dès l'incubation des biofilms dans les réacteurs et sur une durée de 40 jours. Les analyses comportent les mesures de l'activité métabolique, des concentrations de bactéries totales, des bactéries cultivables hétérotrophes et des amibes.

III.2.3.4 Etude de l'efficacité du procédé PEROX vis-à-vis des biofilms

Cette étude a été menée dans l'objectif d'étudier l'efficacité du couple H_2O_2 /UV pour le traitement des biofilms dans les tours aéroréfrigérantes. La performance de ce procédé a été comparée à celles des UV et du peroxyde d'hydrogène appliqués séparément. L'efficacité de l'ensemble de ces procédés pour le traitement des biofilms a été mesurée par rapport à une référence non traitée.

La démarche expérimentale suivie pour ces essais se compose de 3 étapes (figure28) :

- 1- une étape de colonisation des lames de verre par les biofilms : 15 jours consiste à incuber dans la source Soufre ;
- 2- une étape d'adaptation des biofilms aux conditions artificielles de l'expérimentation après leur transfert au laboratoire ;
- 3- Une étape de traitement qui consiste à appliquer les différents procédés de traitement sur les biofilms. Les prélèvements biologiques pour l'étude de l'efficacité des différents procédés sont réalisés durant cette étape.

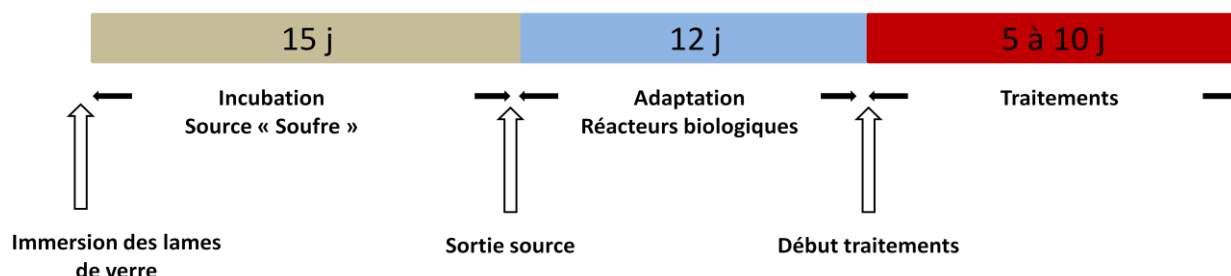


Figure 28 : Schéma récapitulatif de la procédure expérimentale pour l'étude de l'efficacité des traitements PEROX

Au préalable des essais de traitement, les cinétique de dégradation de l' H_2O_2 dans les différentes conditions de l'expérimentation ont été réalisées aux concentrations de 10, 30 et 50 ppm d' H_2O_2 en présence et en absence des radiations UV et dans de l'eau brute ou supplémentée de matière organique.

III.2.3.4.1 Injection et contrôle des concentrations d' H_2O_2

L'injection de l' H_2O_2 est assurée par une pompe doseuse qui permet de délivrer l' H_2O_2 pour le maintien des concentrations définies. La concentration de l' H_2O_2 est contrôlée tout au long de l'expérience par la méthode au chlorure de titane. Brièvement, 5 ml de l'échantillon sont prélevés dans un tube à essai, 200 μ L de chlorure de titane et 200 μ L d'acide sulfurique sont ajoutés à l'échantillon. L'absorbance de l'échantillon est ensuite mesurée à 410 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Cary 50). La concentration de l' H_2O_2 est par la suite déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée préalablement.

III.2.3.4.2 Les variantes étudiées du procédé PEROX

III.2.3.4.2.1 Peroxyde d'hydrogène

Le traitement à l' H_2O_2 seul a été réalisé à 2 concentrations : 50 et 30 ppm. L'injection de l' H_2O_2 est assurée par une pompe doseuse réglée pour délivrer des quantités d' H_2O_2 afin de maintenir la concentration d' H_2O_2 définie.

III.2.3.4.2.2 Irradiations UV (UVC)

Le traitement aux UV est réalisé à l'aide du même dispositif expérimental. L'eau circulante a été soumise à un traitement aux UV (60 mJ/cm^2 , 254nm) par le passage dans le réacteur UV. La recirculation de l'eau a été assurée par une pompe centrifuge d'un débit de 500 L/h. Une seule puissance de lampe UV a été testée lors de ces essais (33W).

III.2.3.4.2.3 Couplage H_2O_2 /UV

Le traitement par le couple H_2O_2 /UV (60 mJ/cm^2 , 254nm) a été réalisé dans les mêmes conditions à l'aide du même dispositif expérimental. Trois concentrations d' H_2O_2 ont été testées : 10, 30 et 50 ppm. Ces concentrations ont été maintenues à l'aide de la pompe doseuse qui injecte l' H_2O_2 pour le maintien des concentrations ciblées.

III.2.4 Particularité des traitements SECUROX

III.2.4.1 Démarche expérimentale

La démarche expérimentale de cette étude est similaire en partie à celle de l'étude du procédé PEROX. Cette étude se compose en effet d'une phase d'incubation, d'une phase d'adaptation, d'une phase de traitement et enfin d'une phase de reviviscence (figure 29).

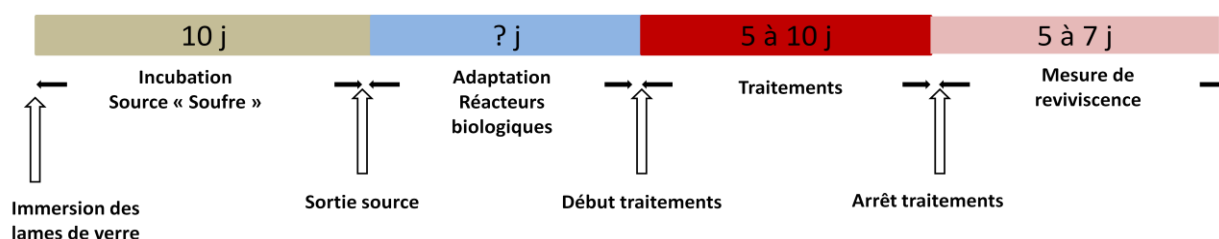


Figure 29 : Caractéristiques des quatre phases des études expérimentales du traitement SECUROX

Les biofilms sont récoltés par immersion dans la source « soufre » évoquée précédemment, pendant 10 j, de lames de verre neuves. Dans un second temps, les lames de verre colonisées sont ramenées au laboratoire et disposées dans des réacteurs biologiques où elles sont mises en incubation pendant quelques jours pour permettre aux biofilms de s'adapter aux conditions expérimentales. Les tests proprement dits sont réalisés dans un 3^{ème} temps, par application du traitement étudié aux réacteurs biologiques. La dernière phase de l'expérience débute avec l'arrêt du traitement et le suivi de l'évolution des biofilms pour la mise en évidence d'une éventuelle reviviscence.

Les durées des phases d'incubation ont été raccourcies par rapport à celle des essais PEROX afin d'introduire dans le temps d'expérience, la phase, d'observation d'une éventuelle reviviscence des bactéries fixées. De plus, l'eau de recirculation utilisée dans les réacteurs biologiques provenant du réseau de distribution d'eau potable du Bourget du Lac n'a pas été supplémentée de matière organique.

Le changement de la durée d'incubation des biofilms dans la source « S » et les conditions d'incubation des biofilms dans les réacteurs biologiques justifient donc une seconde étude pour la détermination de la durée de la phase d'adaptation des biofilms aux conditions expérimentales.

L'interprétation des résultats doit tenir compte du fait que ce raccourcissement et l'absence d'un apport nutritif peut avoir des conséquences sur la sévérité des tests appliqués :

- les biofilms sont utilisés pendant la phase particulièrement active (phase de croissance), ce qui peut favoriser les processus de reviviscence ;
- à l'inverse, leur épaisseur encore faible les rend plus vulnérables vis-à-vis des biocides ;
- l'absence d'un apport nutritif pourrait aboutir, dans le cas d'expériences prolongées, à une réduction naturel de la charge microbologique des biofilms sous l'effet de la privation nutritionnelle.

III.2.4.2 Dispositif expérimental

Pour chacun des essais, le dispositif expérimental des essais SECUROX comportait trois bancs, chacun composé de trois réacteurs (triplicat) reliés à des réservoirs d'eau de 100L (figure 30 et figure 31). Une pompe centrifuge assurait la recirculation de l'eau entre ces réservoirs et les réacteurs à un débit de $14,8\text{L/h} \pm 0,5\text{L/h}$, ce débit a été maintenu lors de tous les essais.

Un automate Thétis Environnement était programmé pour gérer les injections de ClO_2 dans les réservoirs des bancs "essai" selon deux modalités : continue et discontinue. Le réservoir alimentant le banc de référence n'était évidemment pas traité.

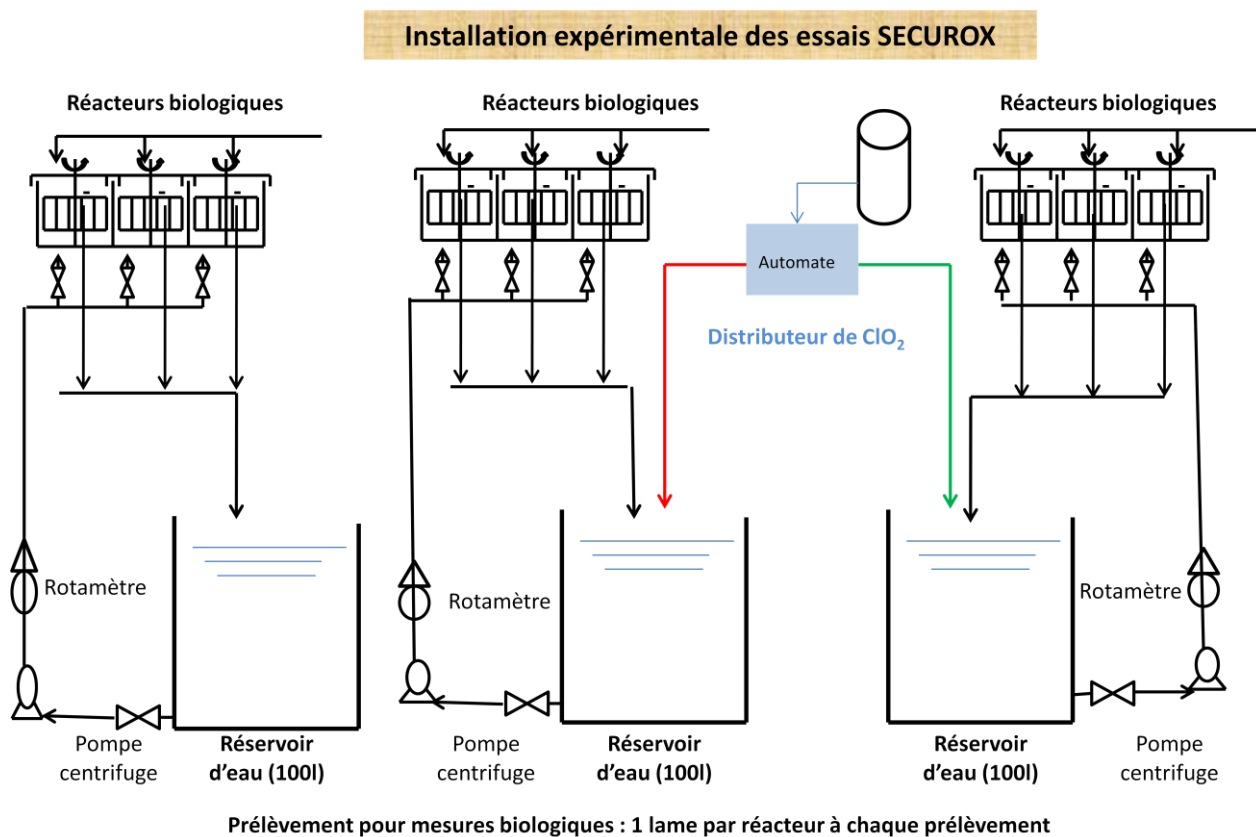


Figure 30 : Schéma du dispositif expérimental des essais SECUROX (→ injection continue, → injection discontinue)



Figure 31. Disposition des bancs de réacteurs biologiques (un banc "témoin" et deux bancs "essai", pour chacune des expériences).

Chaque banc est constitué de trois réacteurs dans lesquels les supports des lames de verre sont animés d'un mouvement de rotation. Une pompe centrifuge assure la circulation de l'eau à partir de réservoirs de 100 L. L'incubation est réalisée sous une bâche obscure afin de prévenir tout développement d'organismes photosynthétiques.

III.2.4.3 Adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire

Cette étude a été réalisée préalablement pour les essais PEROX. Le changement des durées d'incubation des lames dans la source « S » et les conditions d'incubation des biofilms dans les réacteurs biologiques ont nécessité de refaire une étude d'adaptation des biofilms. Mis à part ces changements (durée d'incubation des biofilms dans la source « S », composition chimique de l'eau de recirculation), la même démarche expérimentale que celle suivie lors des essais PEROX a été adoptée pour cette étude. Durant l'étude de l'adaptation des biofilms, seules les concentrations de l'ATP, des bactéries cultivables, des bactéries totales et des amibes ont été suivies.

III.2.4.4 Modalité d'injection et concentration testés du ClO₂

III.2.4.4.1 Modalités d'injection du ClO₂

Le ClO₂ est injecté dans les circuits traités (A et B) à l'aide d'un automate qui délivre le ClO₂ à partir d'une solution mère concentrée par deux modalités : continue et discontinue. L'injection continue est réalisée à l'aide d'un flux permanent permettant de maintenir les concentrations de ClO₂ aux conditions ciblées. L'injection discontinue pilotée par l'automate a été effectuée sur 2 périodes/24 h et sur 4 périodes/24 h.

III.2.4.4.2 Suivi des concentrations du ClO₂

Le suivi des concentrations de ClO₂ a été réalisé grâce à un kit commercial de la société Thétis Environnement qui commercialise également le pilote SECUROX. Le dosage du dioxyde de chlore a été réalisé par la méthode au DPD (Diéthyl-p-Phénylène-Diamine). Le dioxyde de chlore réagit avec le réactif DPD et forme un complexe de coloration rose, l'intensité de cette coloration est proportionnelle à la concentration du ClO₂. L'addition préalable de glycine permet d'éliminer l'interférence du chlore libre. La concentration est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre.

III.2.4.5 Bilan des essais effectués

Lors de cette étude, 3 phases expérimentales ont été conduites et 2 traitements ont été testés à chaque expérience. Chacun des tests de traitement a été suivi d'une mesure de la vitesse de la reviviscence des biofilms pendant les 7 jours suivant la fin du test.

Les doses injectées et les périodes ont été définis pour répondre aux objectifs suivants :

- étude de l'efficacité d'un traitement par une injection continue à une concentration théorique de 0,1 ppm ;
- recherche d'une économie sur la consommation de produit par diminution de la concentration théorique ciblée à 0,05 ppm ;
- comparaison de l'efficacité des traitements par injection continue et discontinue de la même quantité de ClO₂. Lors des traitements discontinu les injections sont distribuées sur au moins 2 périodes/24 h afin de pouvoir les réaliser durant les périodes à faible stripping et à évaporation minimale (pendant la nuit notamment) et donc d'éviter la perte de produit de désinfection.

Tableau 3 : Bilan de l'ensemble des essais réalisés pour l'étude du procédé SECUROX. Valeurs théoriques des concentrations ou des quantités de ClO₂ appliquées.

Phases	n° de l'essai	Modalité d'injection	Concentration ciblée (ppm)	Quantité par injection (mg)*	Dose quotidienne (mg)*
1	1	inj. continue	0,1 ppm	Variable *	*
	2	Discontinue (2 x 30')	**	5	10
2	3	inj. continue	0,05	Variable *	*
	4	Discontinue (2 x 30')	**	25	50
3	5	inj. continue	0,05	variable*	*
	6	Discontinue (4 x 30')	**	6	24

*déterminé à la fin de chaque essai

**concentration mesurée au cours des essais

III.3 Etudes des effets des traitements biocides vis-à-vis des communautés microbiennes fixées et planctoniques dans les conditions de tours aéro-réfrigérantes en vraie grandeur.

III.3.1 Démarche expérimentale

La démarche expérimentale adoptée pour l'étude de la performance du ClO_2 et de l' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ vis-à-vis des biofilms développés dans des TARs repose principalement sur l'analyse des biofilms. Des supports artificiels sont immergés dans l'eau du bassin des tours et attachés de façon efficace pour éviter leur détachement. A chaque essai, 4 supports sont déposés dans la tour, chaque support comporte 3 lames. Les supports sont donc prélevés tous les 15 jours en raison d'un support par prélèvement. L'analyse des biofilms développés sur ces supports permet de suivre la croissance des biofilms sous l'effet des traitements à différentes durées d'incubation. Les parois naturelles des tours sont également prélevées *in situ* et les biofilms sont analysés de la même manière que les supports artificiels. Cette analyse permet en effet de mettre en évidence l'état de contamination des TARs sous l'effet des différents traitements.

Trois campagnes de prélèvements ont été réalisées dans deux sites comportant chacun deux TARs durant les 3 ans qui ont été consacrés à cette étude. La présence de deux TARs dans les deux sites a permis de comparer l'efficacité du ClO_2 au traitement en place, lors des deux premières campagnes et l'efficacité de ClO_2 et de l' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, lors de la dernière campagne. Pour des raisons réglementaires il a été impossible de disposer d'une TARs non traitée, qui aurait permis d'estimer l'efficacité réelle des deux biocides par rapport à une référence non traitée.

III.3.2 Sites d'échantillonnage

Deux sites ont été accessibles sur la commune de Grenoble pour la réalisation de tests en vraie grandeur : celui du campus de Minatec et celui du siège du Conseil Général de l'Isère (CG38). Dans les deux cas, la tour traitée au Securox a été comparée à une tour sur laquelle un autre traitement était appliqué : le couple isothiazolone – DBNPA dans le cas du site de Minatec et de la 1^{ère} campagne du site du CG38, le couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ dans le cas de la 2^{ème} campagne du même site.

Les tours du site de Minatec fonctionnent en permanence pour le refroidissement de procédés industriels. Celles du CG38 utilisées pour la climatisation de bureaux ont un fonctionnement saisonnier. Les principales caractéristiques des TARs des deux sites sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Principales caractéristiques des TARs des deux sites retenus pour l'étude de la performance de ClO_2 et de l' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$

	Minatec	CG38
type de TAR	fermée	fermée
volume circuit (m ³)	6	2
puissance (KW)	1930	420
matériaux	inox, PVC	inox, PVC, acier
rapport de concentration	2,7 – 3,7	1,8
utilisation	permanente	saisonnière
eau d'appoint	eau adoucie	eau adoucie
consommation d'eau (m ³ /jour)	14	8

III.3.1 Campagnes de mesure et traitements appliqués

III.3.1.1 Campagne 2009

La première campagne a été effectuée en 2009 sur le site de Minatec en substituant, sur une tour, le procédé Securox au traitement d'origine. La référence était constituée par une seconde tour sur laquelle le traitement d'origine était maintenu.

La campagne a été subdivisée en deux phases en correspondance avec l'application de deux concentrations de ClO₂. L'injection du ClO₂ était réalisée directement dans le bac froid de la tour. Le tableau 5 résume les principales caractéristiques des traitements appliqués lors de cette campagne de prélèvements.

Tableau 5 : Caractéristiques des traitements appliqués lors de la campagne de prélèvement de 2009

	Volume du circuit (m ³) (volume d'appoint journalier)	Traitement de référence		ClO ₂	
		Isothiazolone	DBNPA	[ClO ₂] résiduelles	Apport journalier (g/jour)
Essai 1	6 (12)	100 g/m ³ , 2 chocs par semaine de 15 minutes	150 g /m ³ , 2 chocs par semaine de 10 minutes	0,1 ppm	144*
Essai 2	6 (12)	100 g/m ³ , 2 chocs par semaine de 15minutes	150 g /m ³ , 2 chocs par semaine de 10 minutes	0,05 ppm	72*

*Calculés à la fin de chaque essai

III.3.1.2 Campagne 2010

Cette campagne ainsi que celle de 2011, ont été effectuées sur le site du Conseil Général de l'Isère (CG38). Comme indiqué précédemment, les tours ne sont mises en services que lors des "saisons chaudes", généralement du mois d'avril au mois d'octobre. Le traitement d'origine des deux TARs du site était réalisé en alternance par le DBNPA et l'Isothiazolone aux concentrations données dans le tableau 6.

Ce traitement, maintenu sur l'une des deux tours a été pris pour référence vis-à-vis de celui appliqué sur l'autre tour. Des problèmes de communication entre les partenaires ont eu pour conséquence le maintien du traitement choc à l'Isothiazolone qui s'est donc superposé durant toute l'expérience, à l'application du ClO₂ selon le procédé Securox. L'injection était réalisée en tête de la boucle de recirculation de la tour afin de minimiser le stripping du ClO₂ et dont la valeur est cependant restée élevée, de l'ordre de 70%.

Les traitements seront désignés respectivement DBNPA /ISO et ClO₂/ISO dans les paragraphes qui suivent. Le tableau 6 résume les principales caractéristiques des traitements appliqués lors de cette campagne de prélèvement.

Tableau 6 : Caractéristiques des traitements appliqués lors de la campagne de traitement de 2010

Volume du circuit (m ³) (volume d'appoint journalier)	Traitement de référence		Traitement d'essai	
	Isothiazolone	DBNPA	[ClO ₂] Résiduelles (g/jour)	Isothiazolone
Essai 1 2(8)	100 g/m ³ , 2 chocs par semaine de 15 minutes	150 g /m ³ , 2 chocs par semaine de 10 minutes	0,1 ppm (5)	100 g/m ³ , 2 chocs par semaine de 15 minutes
Essai 2 2 (8)	100 g/m ³ , 2 chocs par semaine de 15 minutes	150 g /m ³ , 2 chocs par semaine de 10 minutes	0,1 ppm (5)	100 g/m ³ , 2 chocs par semaine de 15 minutes
Essai 3 2 (8)	100 g/m ³ , 2 chocs par semaine de 15 minutes	150 g /m ³ , 2 chocs par semaine de 10 minutes	0,1 ppm (6.5)	100 g/m ³ , 2 chocs par semaine de 15 minutes

III.3.1.3 Campagne 2011

La campagne de 2011 réalisée dans le site du CG38, a été consacrée à la poursuite de l'étude des effets du procédé Securox sur le site du CG38, en parallèle avec le procédé Perox dans lequel du peroxyde d'hydrogène est associé à une irradiation par UV.

L'objectif pour cet essai, était de maintenir une concentration d'H₂O₂ dans le bassin froid de 20 ppm, valeur inférieure à la concentration minimale (30 ppm) pour laquelle une performance optimale du procédé avait été obtenue à l'échelle expérimentale. Nous avons estimé en effet, que les biofilms qui se développent dans les tours du site du CG38 devaient être moins concentrés en microorganismes que ceux étudiés lors de la phase expérimentale. De plus l'eau d'appoint des TARs est celle du réseau d'eau potable de la ville de Grenoble qui passe, en outre, par un adoucisseur. Sa charge en carbone organique inerte et en bactéries est donc très faible. Le ClO₂, quand à lui, il a été appliqué à la concentration de 0,1 ppm avec un objectif d'injection de 1g par jour. Le tableau 7 représente les concentrations réelles appliquées lors de cette campagne obtenues après la fin des essais.

Tableau 7 : Caractéristiques des traitements appliqués lors de la campagne de traitement de 2011

Volume du circuit (m ³) (volume d'appoint journalier)	Traitement PEROX		Traitement d'essai	
	[H ₂ O ₂] mg/L* (Apport mg/J)	UV (W électrique)	[ClO ₂]* Résiduelles	Apport (mg/Jour)*
Consigne	20 (?)**	110	0,1	1000
Essai 1 2(8)	7,0 (2240)	110	0,11	750
Essai 2 2 (8)	4,9 (3119)	110	0,07	1200
Essai 3 2 (8)	4,3 (4236)	66	0,08	1500

*Obtenus après les calculs en fin des essais

**valeur consigne de traitement, définie en fonction des résultats des essais expérimentaux

III.3.2 Traitements biocides sur les sites

III.3.2.1 Traitement de référence

Le traitement de référence appliqué sur ce site est un traitement choc alterné à l'Isouthiazolone à 100 ppm et le DBNPA à 150 ppm en raison d'une fois par semaine pour chaque biocide.

III.3.2.2 Traitement au ClO_2 (Securox)

Le ClO_2 est produit *in situ* par voie chimique à l'aide d'un générateur fourni par la société Thétis Environnement : SECUROX[®] à partir d'une solution de chlorite de sodium et d'acide chlorhydrique. Ce même générateur permet de distribuer en continu des quantités constantes et réglables de ClO_2 permettant le maintien d'une concentration stable dans les tours. Il est injecté sur la boucle de recirculation de la tour. Le ClO_2 est un produit hautement volatil, lorsque l'eau entre en contact avec l'air, une grande proportion de ClO_2 est éliminée par le phénomène de stripping (70%). Deux concentrations de ClO_2 ont été testées lors de ces campagnes de prélèvements : 0,1 ppm et 0,05 ppm.

III.3.2.3 Traitement au couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$

L'injection du peroxyde d'hydrogène était réalisée directement dans le bassin froid de la TAR à l'aide d'une pompe péristaltique Gilson Minipuls 3 et à partir d'une solution mère concentrée (50% ou 70% d' H_2O_2) fournie par la société ARKEMA.

Les UV-C associés à l'injection d' H_2O_2 étaient apportés par deux tubes à vapeur de mercure basse pression, fournis par la société BIO-UV, émettant à une longueur d'onde de 254 nm et fixés à des supports inox installés directement dans le bassin froid de la TAR (figure 32). Pour rappel, dans les essais expérimentaux du procédé, la lampe UV était montée en ligne sur une boucle de dérivation annexée au réservoir principal du montage. Cette configuration n'a pas été retenue dans le cas des TARs en grandeur industrielle en raison des aménagements importants qu'elle nécessitait.

Tube en verre contenant un tube UV dans le cas de la tour "PEROX" et vide dans le cas de la tour "SECUROX"



Support métallique inoxydable

Figure 32 : Dispositif de fixation d'une lampe UV et des supports artificiels pour l'étude de la croissance des biofilms dans les tours aéro-réfrigérantes.

Deux dispositifs permettant la fixation de deux lampes UV et les supports artificiels ont été placés dans la tour traitée à l' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$. Un dispositif similaire ne comportant pas de lampe UV a été placé dans la tour traitée au ClO_2 dont l'unique rôle est la fixation des supports artificiels.

Plusieurs taux de traitements ont été testés pour le procédé $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$: trois concentrations (flux) d' H_2O_2 et 2 doses de radiation UV ont été appliquées (lampes à 55 W électrique ou à 33 W électrique). Le tableau 8 résume ces taux de traitements.

Tableau 8 : Différent taux de traitement appliqués pour le procédé H₂O₂/UV

TAUX DE TRAITEMENT	H ₂ O ₂ /UV		
	Dose UV (J.cm ⁻²) 2 lampes	Concentration résiduelle d' H ₂ O ₂ (mg.L ⁻¹)*	Flux injecté (g.h ⁻¹)*
Essai 1	5,9 (110W)	7,0	2,2
Essai 2	5,9 (110W)	4,9	3,2
Essai 3	2,3 (66 W)	4,3	4,2

*Calculés à la fin des essais

III.3.3 Modes d'échantillonnages

III.3.3.1 Substrats en place

Les biofilms ont été échantillonnés à l'aide d'un dispositif d'échantillonnage mis au point à l'UMR CARTEL, spécifiquement pour le projet Legiosecure. Il s'agit d'une enceinte appliquée sur une paroi qui isole une surface de 78 cm² et une partie de l'eau qui est à son contact (volume de l'ordre de 200 ml). Un moteur électrique anime alors des brosses stériles dans un mouvement épicycloïdal, ce qui a pour effet de détacher le biofilm de son support (figure 33). La durée de grattage a été fixée à 2 minutes pour tous les prélèvements. Le volume d'eau enfermé dans la chambre de grattage est récupéré dans des flacons stériles à l'aide d'une pompe péristaltique puis transporté au laboratoire dans une glacière pour analyse.

Les parois et le fond de chacune des tours ont fait l'objet d'échantillonnages séparés et, dans chacun des cas, étaient répétés 3 fois afin de disposer d'échantillons en triplicats.

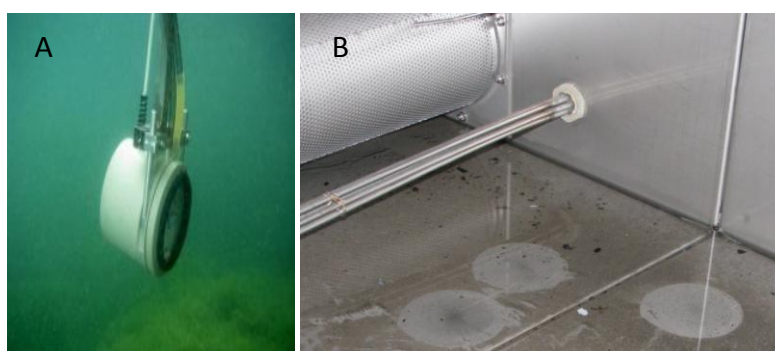


Figure 33 : Dispositif d'échantillonnage des substrats en place (A). La photo (B) montre l'empreinte laissée par l'échantillonneur après le prélèvement des biofilms sur le fond du bassin froid d'une TAR.

Cet échantillonnage de biofilms sur les substrats en place a été réalisé à la fin de chacune des phases qui composaient chaque campagne.

III.3.3.2 Substrats artificiels

Ce mode d'échantillonnage consiste à exposer des substrats artificiels (ici des lames de verre pour microscopie, de dimensions 26 x 76 mm x 1.5 mm) à l'eau des bassins froids des tours pour une période de 15 jours durant lesquels ils sont colonisés par des biofilms. La vitesse et l'importance des développements microbiens s'établissent donc sous les contraintes imposées par le traitement appliqué à la tour.

Chaque lame était insérée dans un tube de polypropylène de 50 ml ouvert à ses deux extrémités pour permettre la circulation de l'eau (figure 34 A). Les tubes étaient groupés par trois pour constituer une unité d'échantillonnage.

Deux modes d'accrochage des tubes dans les tours ont été utilisés :

- suspendus à une cordelette coulissante (figure 34 B), lors des campagnes 2009 et 2010 ;
- fixés par des clips à des plaques en plastique opaque destinées à les protéger d'une incidence directe des rayons UV (figure 35), elles mêmes fixées sur un bâti métallique pesant (figure 32), lors de la campagne 2011.

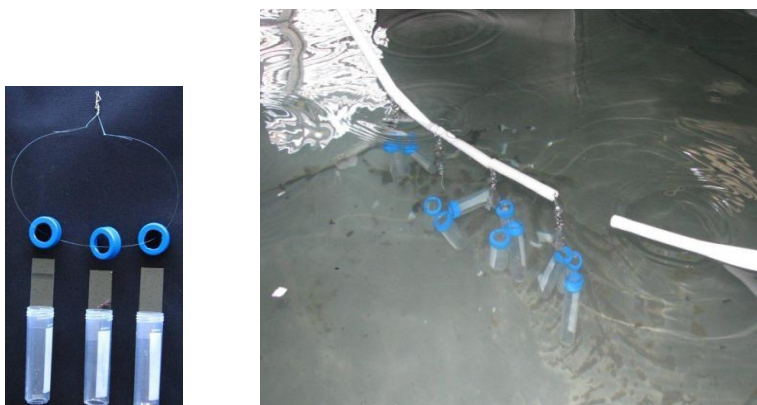


Figure 34 : Disposition des lames dans les tubes d'accrochage des supports artificiels dans les tours aérorefrigérantes (A) accrochage de 3 tubes contenant chacun une lame de verre. (B) accrochage des supports à l'aide d'un fil permettant l'immersion des supports dans la bache de la tour



Figure 35 : Disposition des lames de verre dans des tubes accrochés à un support métallique pour leur maintien dans le fond de la bache.

Lors de cette campagne, la géométrie du dispositif de maintien des supports des lames placées dans les deux tours était identique.

Pour chacun des essais de traitement (c'est-à-dire pour chacune des phases d'une campagne), l'évolution des indicateurs des biofilms a été suivie durant 2 mois à raison de l'échantillonnage d'un jeu de trois lames tous les 15 j (soit 4 x 3 échantillons par phase). Le choix de cette période de deux mois relève d'un compromis entre l'obtention de valeurs significatives des indicateurs des biofilms et le souhait de tester plusieurs variantes des traitements dans le laps de temps limité du fonctionnement des tours.

III.4 Etudes des effets des traitements PEROX vis-à-vis de la matière organiques (en absence de biofilm)

Cette étude a été réalisée dans l'objectif de mesurer l'effet des traitements PEROX (uniquement) vis-à-vis des concentrations du carbone organique dissous et biodégradable. Elle avait pour but de confirmer ou non l'hypothèse de l'effet indirect par privation nutritionnelle du procédé H₂O₂/UV vis-à-vis microorganismes.

Deux méthodes différentes sont décrites dans la bibliographie pour le dosage de la fraction biodégradable de la matière organique. Ces techniques quantifient les concentrations de la matière organique biodégradable en se basant sur deux principes différents. Le premier, est basé sur le suivi de la croissance de souches bactériennes pures (carbone organique assimilable, COA) (Van der Kooij *et al.*, 1982). Le second est basé sur la consommation de carbone organique dissous par une flore bactérienne environnementale (CODB) (Servais *et al.*, 1987 ;1989).

III.4.1 Mesure du carbone Organique Assimilable (AOC)

Le carbone organique assimilable correspond à la fraction du carbone organique total (COT) utilisée par un inoculum bactérien pour la croissance. La technique de dosage du COA consiste à ensemercer un échantillon d'eau par un inoculum bactérien constitué de souches bactériennes pures : *Pseudomonas fluorescens* (P17), de *Spirillum sp.* (NOX) (Van der Kooij *et al.*, 1982). La croissance bactérienne est suivie par un dénombrement bactérien sur un milieu gélosé. Le nombre maximum de bactéries dénombrées est considéré comme un indice de COA. Cet indice est converti en unités de COA (mg/L) à l'aide de courbes d'étalonnages obtenues par la mesure de la croissance bactérienne en présence de concentrations standards de composés organiques tels que l'acétate et l'oxalate. Une corrélation significative a été montrée entre la concentration en COA et la densité des bactéries hétérotrophes dans des réseaux de distribution d'eau (Van der Kooij *et al.*, 1982 ; LeChevallier *et al.*, 1987).

Le COA représente une fraction faible du COT et varie en général de 0,1 à 9 % du COT. Van der Kooij *et al.* (1982) ont montré qu'à des concentrations inférieures à 10 µg/L de COA, la densité des bactéries hétérotrophes d'un réseau de distribution non chloré n'augmente pas. LeChevallier *et al.* (1987) ont montré que des concentrations de COA inférieures à 100 µg/L limitent la reviviscence des coliformes dans un réseau de distribution contenant de 3 à 6 mg/L de résidu de chlore.

Cette méthode ne permet pas de réaliser un dosage direct du carbone hydrolysable par les bactéries. Elle fournit plutôt des indices de la croissance bactérienne obtenue par l'utilisation de la matière organique de l'échantillon. De plus, le dosage indirect du COA est effectué par l'intermédiaire de deux souches bactériennes pures, *Pseudomonas fluorescens* souche P17 ou *Spirillum sp.* NOX, la quantification de COA dépend donc de la capacité métabolique de ces bactéries.

III.4.2 Mesure du carbone organique dissous biodégradable (CODB)

Le carbone organique dissous biodégradable (CODB) est la fraction du carbone organique dissous (COD) hydrolysable par les bactéries hétérotrophes. Le COD est définie comme la fraction du carbone organique total dissoute ou particulaire inférieure à 0,2 µm. Le dosage du CODB consiste à mesurer la consommation du COD d'un échantillon d'eau ensemercé par une flore

bactérienne autochtone et incubé pendant 30 jours. La concentration du CODB correspond à la différence entre la concentration initiale et la concentration minimale de COD de l'échantillon observée durant la période d'incubation (Servais *et al.*, 1987, 1989).

Le CODB représente 10 à 30% du carbone organique dissous totale dans les eaux de distribution. Servais *et al.* (1993) définissent le CODB comme un indicateur de la stabilité biologique des eaux et associent cette stabilité biologique (pas de développement bactérien) à une concentration de CODB ne dépassant pas 0,16 mg/L et cela même en absence de désinfectants.

Cette méthode de mesure de CODB est très simple à réaliser. La concentration minimale détectable par cette méthode est de 0,1 mg/L. Cette concentration dépend tout de même de la limite de détection de l'analyseur de carbone du fait que le CODB correspond à la différence entre deux mesures de COD. La source de l'inoculum bactérien ne constitue pas une source de variation des dosages de CODB (Prevost *et al.*, 1992 ; Servais *et al.*, 1989). En effet, Servais *et al.* (1989) ont mesuré le CODB de l'eau de la Seine en utilisant trois inoculums bactériens d'origines différentes. Les résultats de ces mesures ne montrent aucune différence significative entre les concentrations du CODB obtenues par l'utilisation de ces trois inoculums.

C'est donc par la mesure du CODB que nous avons étudié les effets du traitement Perox vis-à-vis de la fraction biodégradable du carbone organique.

Des solution de matières organiques ont donc été préparées puis soumises au traitement approprié. Les concentrations du COT et du COD ont été mesurées avant et après les traitements afin de mettre en évidence les effets quantitatifs des traitements appliquées sur la matière organique. Ces solutions ont par la suite été incubées en présence d'une suspension bactérienne environnementale pendant 35 jours à température ambiante et avec agitation. Les concentrations du COT et du COD ont de nouveau été mesurées en fin d'incubation et les concentrations du CODB (carbone organique dissous biodégradable) ont été calculées.

Trois essais de traitement ont été réalisés avec des procédures de préparation des solutions de matières organiques différentes. Ces 3 essais sont donc décrits séparément dans les paragraphes suivants.

Précisions :

- Les solutions de matières organiques ont été traitées selon le même mode opératoire : même dispositif expérimental, même puissance UV, et même concentration d' H_2O_2 ;
- Lors des traitements H_2O_2 /UV et UV le volume total des solutions traitées est de 6L ;
- Lors des traitements à l' H_2O_2 le volume total des solutions traitées est de 1L.

III.4.3 Préparation de la verrerie

La verrerie utilisée lors de ces essais a été chauffée (brulée) à 550 °C pendant 4 heures au minimum afin d'éliminer toute trace de carbone organique qui pourrait contaminer les échantillons.

III.4.4 Essais 1

III.4.4.1 Préparation des solutions d'acides humiques, de tryptone et du mélange acides humiques/tryptone

Deux solutions de matières organiques ont été préparées dans de l'eau UHQ à raison de 1 g/L : une solution d'acides humiques (Sigma Aldrich, France) et une solution de tryptone (Sigma Aldrich, France).

La solution d'acides humiques a été filtrée sur deux filtres (tamis) de 60 et 20 µm de porosité successivement afin d'éliminer le maximum de particules de matières organiques. Ces deux solutions ont servi comme solutions mères pour la préparation des solutions de matières organiques utilisées dans cet essai. Le COT et le COD de ces deux solutions ont été dosés.

Trois solutions d'un volume de 15 litre et d'une concentration d'environ 3 ppm en COD ont été préparées à partir des deux solutions mères et d'eau traitée par une cartouche BRITA (cartouche de filtration d'eau au charbon actif) (figure 36).

- première solution : 100% de tryptone ;
- deuxième solution : 100% d'acides humiques ;
- troisième solution : un tiers de tryptone et deux tiers d'acides humiques.

Préparation des solutions de matières organiques: Essai 1

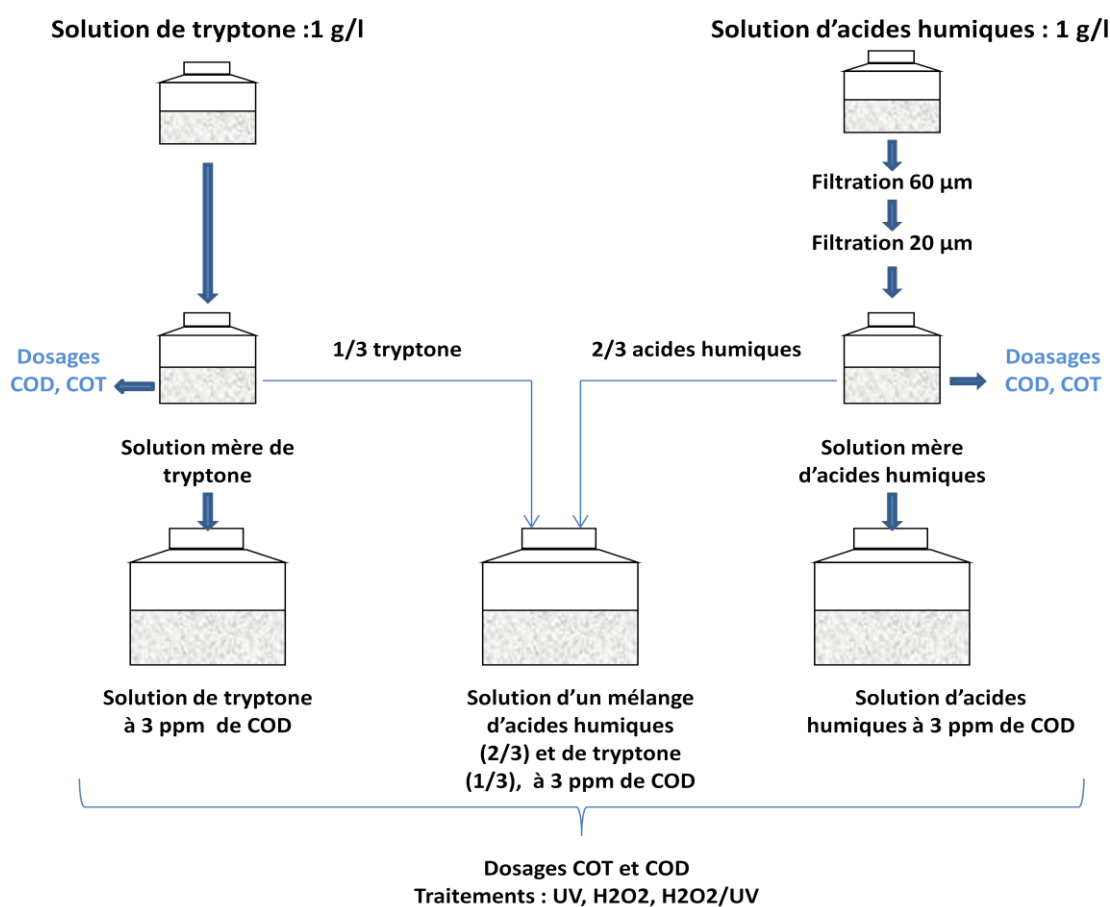


Figure 36 : Schéma récapitulatif de la préparation des solutions de matières organiques utilisées au cours de l'essai 1

III.4.4.2 Procédure de traitement

Les solutions de matières organiques : solution de « tryptone », solution « d'acides humiques », et mélange « tryptone-acides humiques » ont subi de la même manière 3 traitements différents. Chaque solution a été subdivisée en 4 parties :

- 1 litre non traité : solution témoin ;
- 1 litre traité à l' H_2O_2 à 50 ppm pendant 1 h ;
- 6 litres traités aux UV (60 mJ/cm^2 , 254nm) pendant 1 h ;
- 6 litres traités à H_2O_2 (50 ppm)/UV (60 mJ/cm^2 , 254nm) pendant 1 h.

Des dosages de COT et de COD ont été effectués pour l'ensemble des solutions traitées et non traitées. Après les différents traitements, les solutions ont été réparties dans des piluliers brulés (550°C , 4 h) à raison de 120 ml par piluliers. Chaque pilulier a été ensemencé par 200 μl de la suspension bactérienne préparée précédemment. Les échantillons ont ensuite été mis à incuber à l'obscurité, à 25°C et sous agitation. Les prélèvements ont été réalisés après 30 et 35 jours d'incubation (J30 et J35) (figure 37).

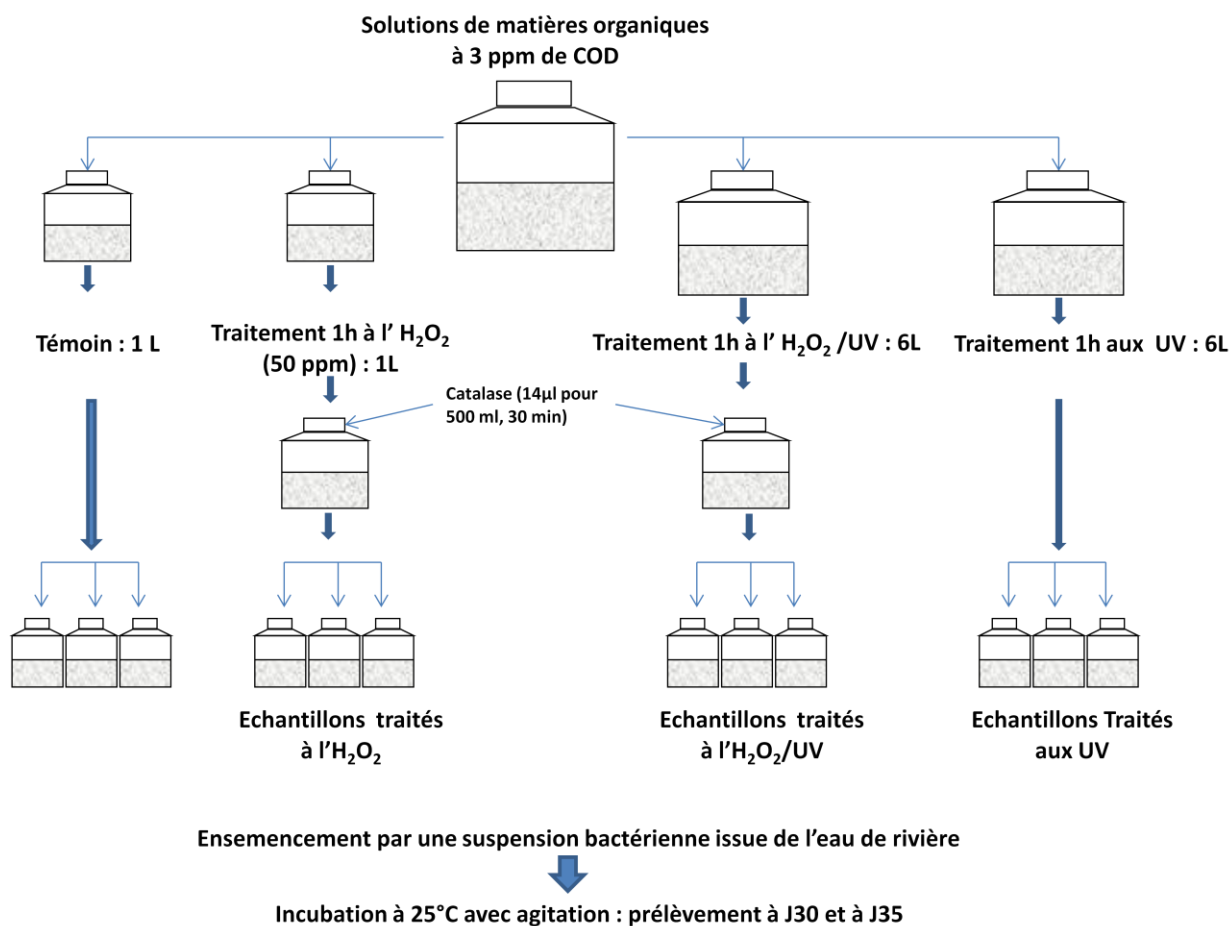


Figure 37 : Schéma expérimental de l'essai 1

III.4.5 Essai 2

III.4.5.1 Préparation des solutions d'acides humiques

Seule des solutions d'acides humiques ont été traitées lors de cet essai. Une solution d'acides humiques a été préparée dans de l'eau UHQ (procédé Millipore) à raison de 1 g/L. Cette solution a été ensuite filtrée successivement sur deux filtres (tamis) de 60 et de 20 μm de porosité afin d'éliminer le maximum de particules de carbone. Cette solution a été désignée solution « standard ».

Une partie de cette solution a ensuite été centrifugée dans des tubes Falcon de 15 ml à 15000 g pendant 30 min et à température ambiante. Le culot a été éliminé et le surnageant a été de nouveau filtré sur une membrane de polycarbonate de 0,2 μm de porosité, préalablement lavé 3 fois avec 10 ml d'UHQ. Cette deuxième solution a été désignée solution « filtrée ».

Le COT et le COD des deux solutions d'acides humiques ont par la suite été dosés et une dilution de 7 litres de chaque solution a été préparée dans de l'eau traitée par une cartouche BRITA à une concentration d'environ 3 ppm en COD (figure 38).

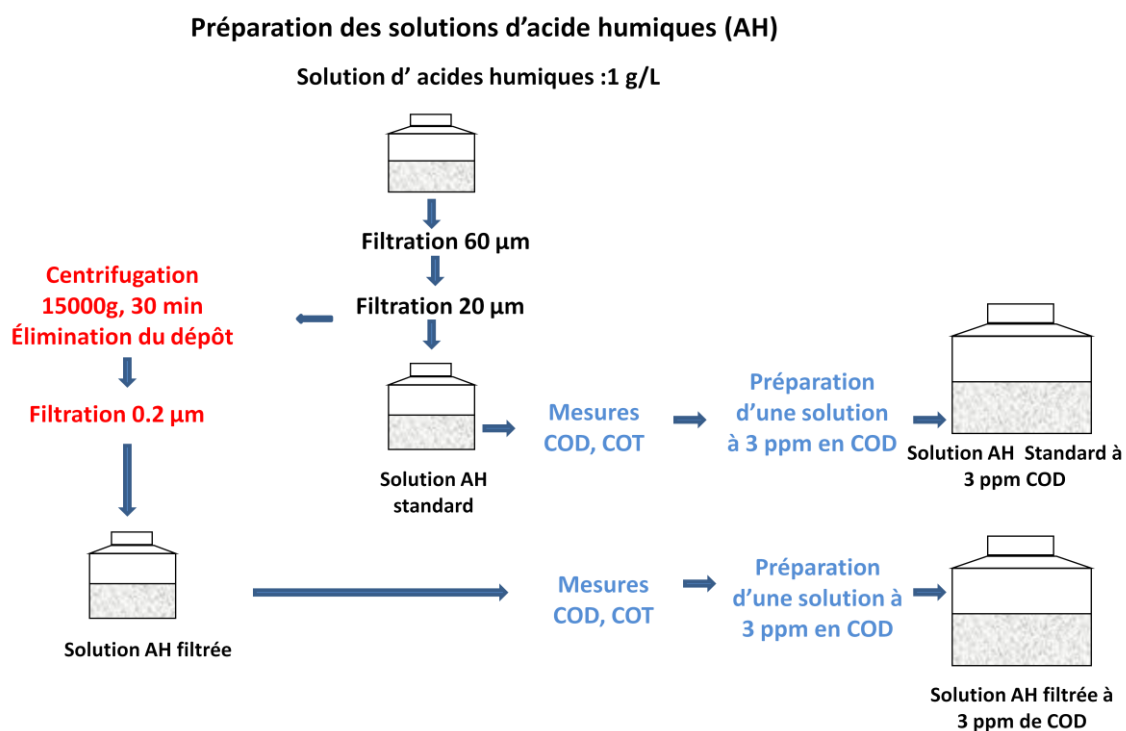


Figure 38 : Schéma récapitulatif de la préparation des solutions d'acides humiques au cours de l'essai 2

III.4.5.2 Procédure de traitement

Les deux solutions d'acides humiques, « standard » et « filtrée », ont subi un traitement par le couple H_2O_2 (50 ppm) /UV (60 mJ/cm^2 , 254 nm) pendant 24 h. Des prélèvements ont été effectués après 1 h, 6 h, et 24 h de traitement. De la même manière que dans l'essai 1, les dosages de COT et de COD ont été effectués pour l'ensemble des solutions, traitées et non traitées. Après les traitements, les solutions ont été réparties dans des piluliers brûlés à raison de 120 ml par piluliers. Chaque pilulier a étéensemencé par 200 μl de la suspension bactérienne préparée précédemment. Les échantillons ont ensuite été mis à incuber à l'obscurité, à 25°C et sous agitation. Les prélèvements ont été réalisés après 30 et 35 jours d'incubation (J30 et J35) (figure 39).

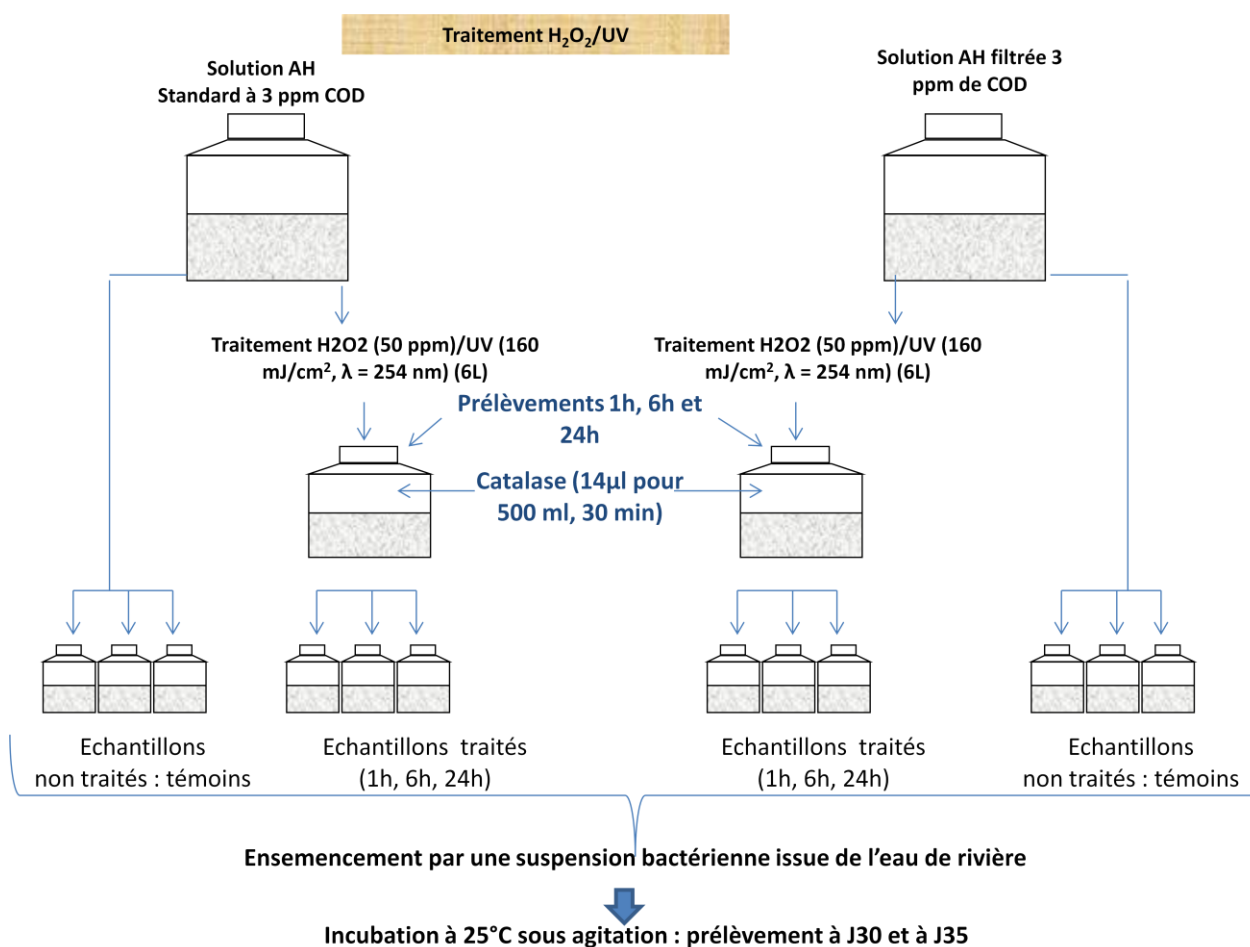


Figure 39 : Schéma expérimental de l'essai 2

III.4.6 Essai 3

III.4.6.1 Préparation des solutions d'acides humiques/tryptone

Seules des mélanges d'acides humiques et de tryptone ont été traités lors de cet essai. La solution de tryptone a été préparée dans de l'eau UHQ en raison de 1g/L. Deux solutions d'acides humiques « standard » et « filtrée » ont été préparées selon le mode opératoire de l'essai 2.

Deux mélanges de solution de matières organiques contenant 1/3 de tryptone et 2/3 d'acides humiques ont été préparés à partir des solutions mères de tryptone, de la solution d'acides humiques standard et de la solution d'acides humiques filtrée. Le premier mélange a été préparé à partir de la solution de tryptone et de la solution standard d'acides humiques et a ainsi été désignée solution « standard ». Le deuxième mélange a été préparé à partir de la même solution de tryptone et de la solution d'acides humiques filtrée et a ainsi été désignée solution « filtrée » (figure 40).

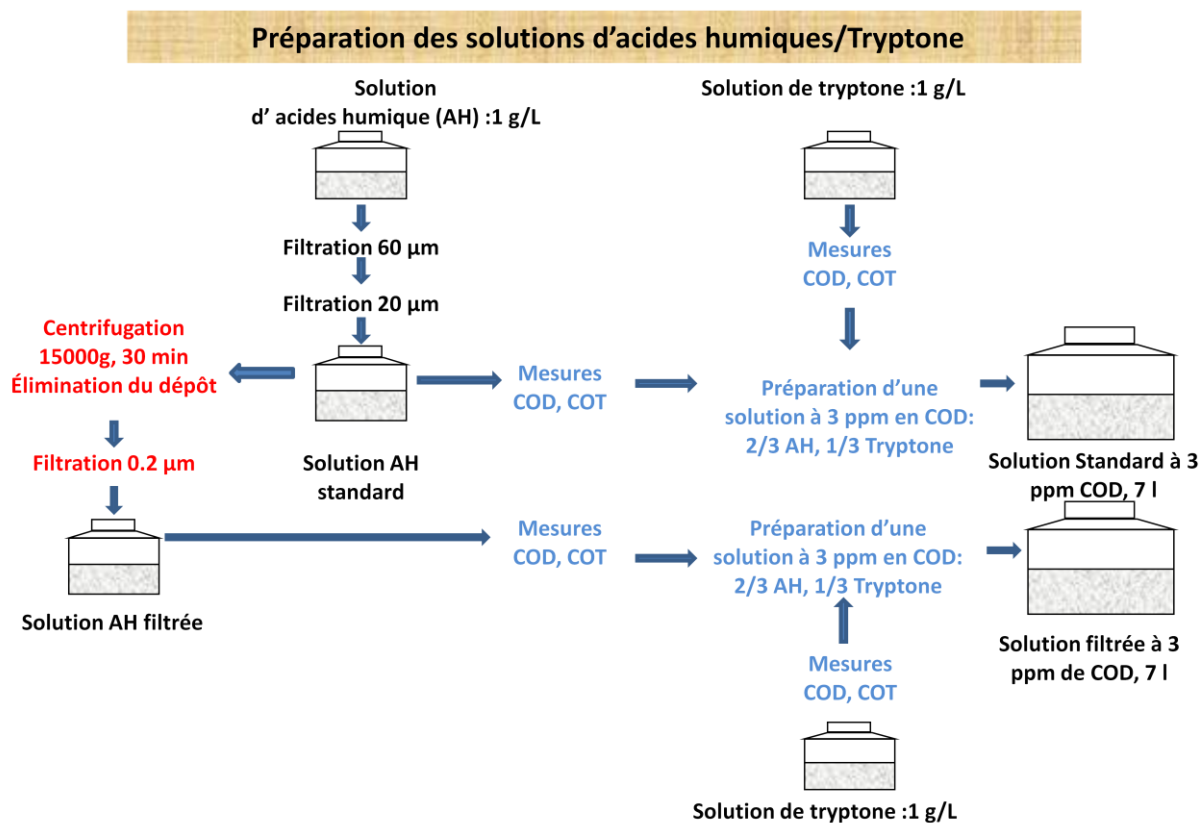


Figure 40 : Schéma récapitulatif de la préparation des solutions d'acides humiques/tryptone au cours de l'essai 3

III.4.6.2 Procédure de traitement

Les deux solutions d'acides humiques/tryptone « standard » et « filtrée » ont été soumises au traitement à l' H_2O_2 seul à 50 ppm, aux UV (60 mJ/cm^2 , 254 nm) et au couple H_2O_2 (50 ppm) /UV pendant 6 h. Des prélèvements ont été effectués après 1 h et 6 h, de traitement. De la même manière que dans les autres essais, les dosages de COT et de COD ont été effectués sur l'ensemble des solutions, traitées et non traitées.

Après les traitements, et après désactivation de l' H_2O_2 résiduel par l'ajout de 14 μl de catalase (1.8 unité/ μl), les solutions ont été réparties dans des piluliers brûlés à raison de 120 ml par piluliers. Chaque pilulier a étéensemencé par 200 μl de la suspension bactérienne préparée précédemment. Les échantillons ont ensuite été mis à incuber à l'obscurité, à 25°C et sous agitation. Les prélèvements ont été réalisés après 30 et 35 jours d'incubation (figure 41).

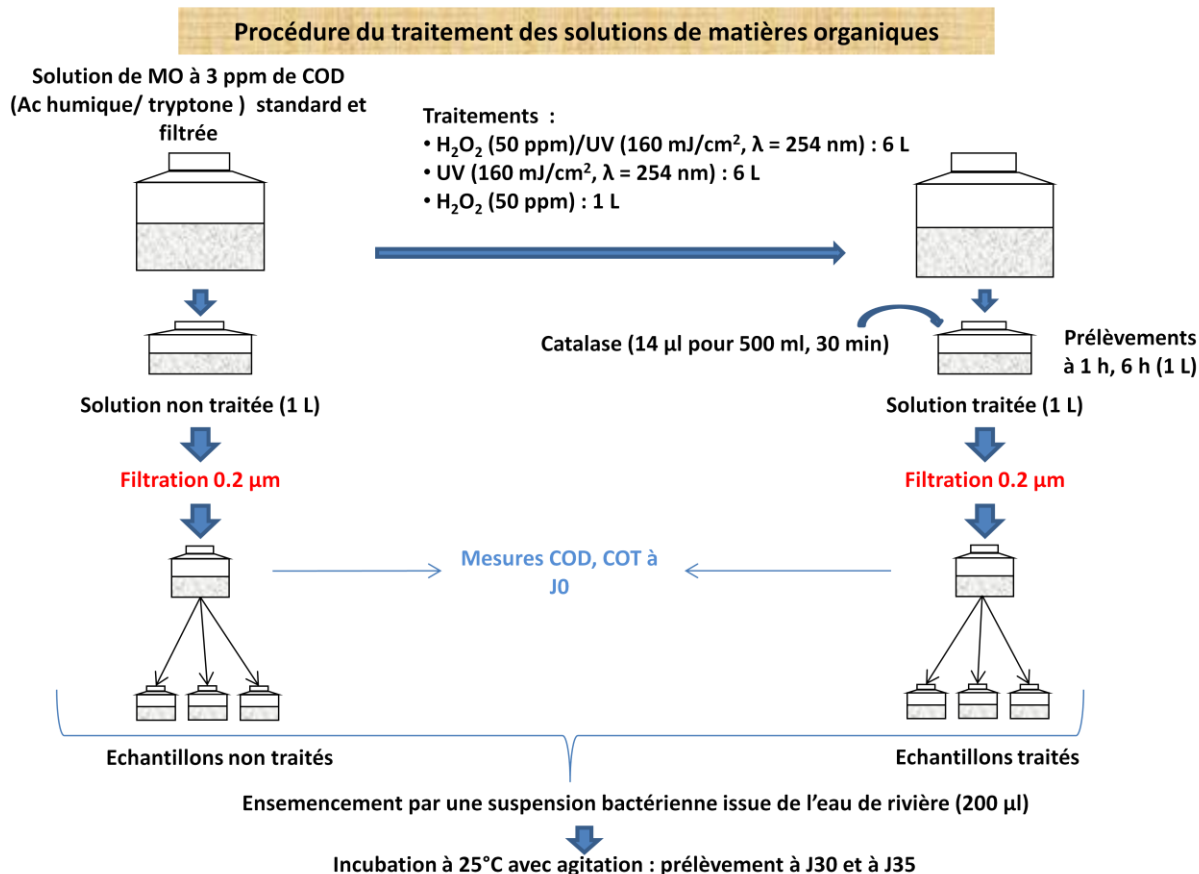


Figure 41 : Schéma expérimental de l'essai 3

III.4.7 Traitements appliqués aux solutions de matières organiques

Le peroxyde d'hydrogène utilisé pour les traitements (35%, Arkema, France) est stocké à l'obscurité à une température de 4°C. Un litre de chaque solution a été prélevé avant l'application des traitements et a servi de solution témoin.

III.4.7.1 Traitement à l'H₂O₂

Un litre de chaque solution de matières organiques a été soumis à un traitement à l'H₂O₂ à 50 ppm pendant 1 h. Après la durée de l'incubation, l'H₂O₂ résiduel a été consommé par l'ajout de 14 μl de la catalase à 1.8 U/μl.

III.4.7.2 Traitement par le couple H₂O₂/UV

Six litres de chaque solution de matières organiques ont été soumis à un traitement par le couple H₂O₂ (50 ppm)/UV (60 mJ/cm², 254nm) pendant 1 h pour l'essai 1 et 24 h pour l'essai 2. La circulation des solutions de matières organiques a été assurée par une pompe centrifuge à un débit de 500 L/h. La concentration de l'H₂O₂ a été maintenue à 50 ppm environ tout au long de l'expérience. A la fin du traitement, l'H₂O₂ résiduel a été consommé par un ajout de catalase (figure 42).

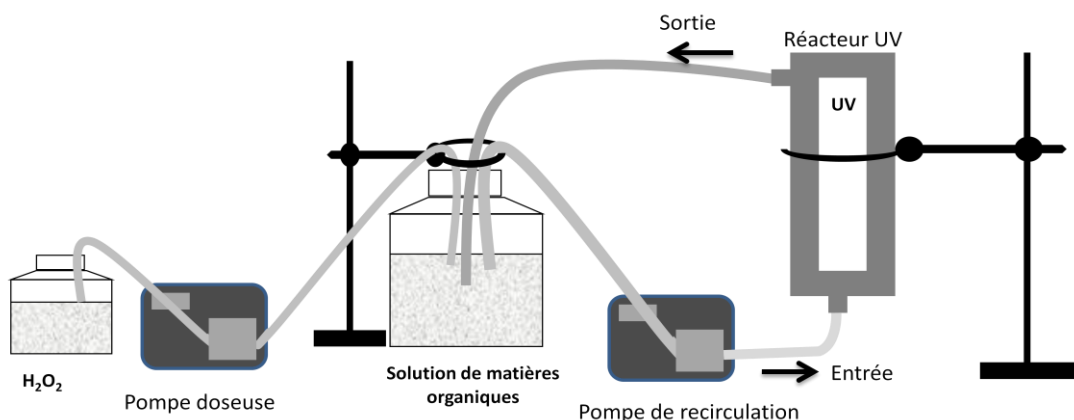


Figure 42 : Procédure de traitement des solutions de matières organiques par le couple H₂O₂/UV

III.4.7.3 Traitements aux UV

Six litres de chacune des solutions de matières organiques ont été soumis à un traitement aux UV (60 mJ/cm², 254nm) pendant 1 h. La recirculation de la solution a été assurée par une pompe centrifuge à un débit de 500 L/h (figure 43).

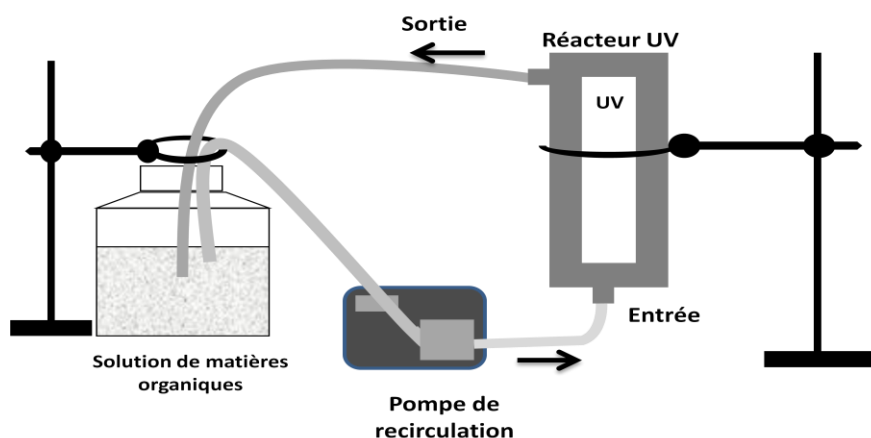


Figure 43 : Dispositif de traitement par les UV des solutions de matières organiques

III.4.7.4 Préparation de la suspension bactérienne

Deux litres d'eau de rivière ont été filtrés sous un vide ne dépassant pas 300 mm de mercure, sur des membranes de polycarbonate de 0,2 µm de porosité et 47 mm de diamètre. Les membranes ont été grattées dans un volume de 5 ml d'eau stérile à l'aide d'un grattoir en inox. La suspension est ensuite récupérée puis filtrée à nouveau sur un filtre en fibres de verre (GF/C) d'une porosité de 1.2 µm pour éliminer les protistes. Le retentat a été réparti à volume égal (200 µl) dans les piluliers contenant les différentes solutions de matières organiques.

III.4.7.5 Dosage du carbone total, dissous et calcul du CODB

Les solutions de matières organiques ont été caractérisées à toutes les étapes de l'expérimentation par des dosages de COT et de COD : à J0 (début de l'incubation), à 30 et 35 jours d'incubation (fin de l'incubation).

La fraction dissoute du carbone organique correspond à la fraction inférieure à 0,2 µm. le COD et le COT sont dosés à l'aide d'un analyseur de carbone (Labtoc, Spectra France). Pour les

dosages du COT, des échantillons de 10 ml ont été prélevés puis conservés à -20°C dans des piluliers préalablement brûlés (550°C, 4 h) dans l'attente des analyses. Pour les dosages de COD, des échantillons de 10 ml ont été prélevés puis filtrés sous un vide ne dépassant pas 225 mm de mercure sur une membrane de polycarbonate de 0,2 µm de porosité et de 25 mm de diamètre préalablement rincée par 3 x 10 ml d'eau UHQ. Les filtrats ont été conservés à -20°C dans l'attente des dosages.

Le CODB est mesurée par la méthode de Servais (Servais *et al.*, 1987 ; 1989). Elle correspond à la quantité de COD consommée par les bactéries de l'inoculum durant 30 et/ou 35 jours d'incubation. La fraction biodégradable correspond à la différence entre les valeurs de COD à J0 et les concentrations mesurées à J30 ou J35 :

$$[\text{CODB}] = [\text{COD}]_{\text{J0}} - [\text{COD}]_{\text{J30/J35}}$$

III.4.8 Caractérisation moléculaire des solutions de matière organique par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC)

Les analyses ont été réalisées par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC) qui associe la chromatographie liquide à haute performance (HPLC, LC20A, Shimadzu), la spectrométrie UV (UVA, SPD-M20A, Shimadzu), et la fluorimétrie (RF-10AXL, Shimadzu). Ce type de dispositif est similaire à celui décrit par Her *et al.* (2002 et 2003).

L'HPSEC a été réalisée sur une chaîne chromatographique à triple détection Viscotek, combinant un réfractomètre, un détecteur de diffusion de la lumière et un viscosimètre. Les colonnes « gel filtration » utilisées sont de type TSK G6000PWXL et TSK G4000PWXL (Viscotek) montées en série. Le tampon utilisé comme phase mobile est un tampon Na₂ PO₄ ; 0,2 M ; pH 6,9, réglé à un débit de 0,75 ml/min, les colonnes et le système de détection étaient maintenus à une température de 30°C. Le volume d'injection de l'échantillon était de 100 µl, et le temps d'analyse de 60 min.

Les poids moléculaires (MW, Molecular weight) des molécules détectées sont liés à la constante K_{av} par l'équation :

$$\log(\text{MW}) = (5,41 - 3,41K_{av}) \pm 0,15 \quad (R^2 = 0,94)$$

$$\text{avec } K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_p - V_o} \quad (\text{Perminova } et al., 2003)$$

V_e: volume d'éluion du soluté

V_p: volume totale de la colonne apparent en utilisant l'acétone (60 Da)

V_o: volume mort apparent déterminé en utilisant le bleu de dextran (2000 kDa)

Les chromatogrammes d'absorption ultraviolette (UVA, 254 nm) sont obtenus grâce à un détecteur à barrette de diodes Shimadzu SPD-M20A. Tous les spectres ont été enregistrés à 254 nm, pour la détection des composés aromatiques.

Deux analyses ont été réalisées sur le plan de la fluorimétrie (Shimadzu RF-10AXL) : La première sur la base du couple de fluorescence : 280 nm (excitation) - 330 nm (émission) caractérisant les acides fluviques et la seconde sur la base du couple 330 nm (excitation) - 440 nm (émission) caractérisant les acides humiques.

III.4.9 Mesure de la toxicité des solutions de matières organiques traitées

A l'issu du troisième essai, la toxicité des différentes solutions de matières organiques (traitées et non traitées) a été mesurée vis-à-vis de *Vibrio fischeri* (anciennement *Photobacterium Phosphoreum* KCTC2852), une bactérie bioluminescente. L'intensité de la bioluminescence de cette bactérie dépend du niveau intra cellulaire de l'ATP et du NADPH et permet donc d'évaluer le statut métabolique de la cellule. La baisse de la bioluminescence est un indicateur de la cytotoxicité du milieu dans lequel *V. fischeri* est cultivé. Ce test standardisé est largement utilisé pour l'évaluation de la cytotoxicité d'un grand nombre de composés chimiques, notamment, ceux rejeté dans l'environnement.

La souche *V. fischeri* a été préalablement cultivée dans un milieu liquide optimisé le NY (Lee *et al.*, 2001). 100 µl de chaque solution de matières organiques à tester sont introduits dans 3 puits (triplicat) d'une microplaque noire de 96 puits. 50 µl d'une solution de NaCl à une concentration finale de 2% et 50 µL de la suspension bactérienne ont été ajoutés dans les puits contenant les solutions de matières organiques. Après 15 min d'exposition, la luminescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (Hidex Chameleon, ScienceTec, Finlande).

La luminescence obtenue dans les puits contenant les solutions de matière organique traitées a été comparée à celle obtenue avec les solutions non traitées.

III.5 Caractérisation des légionelles isolée de la source thermale 'Soufre'

III.5.1 Isolement des souches de *Legionella* environnementales

Des lames vierges placées sur un support en PVC ont été immergées dans la source « Soufre » d'Aix les Bains pour le développement des biofilms. A l'issue d'une période d'incubation de 15 jours, les lames ont été récupérées et transportées au laboratoire dans des glacières contenant aussi de l'eau de cette source de façon à créer une atmosphère humide et ainsi éviter l'assèchement des biofilms pendant le transport.

Les biofilms ont été remis en suspension dans 5 ml d'eau stérile par grattage des lames. Ces suspensions ont subi un traitement aux ultrasons pendant 1 minute afin d'altérer les agrégats de biofilms. L'isolement des légionelles a été effectué en suivant la procédure AFNOR NF T90-431. Cette procédure consiste en un traitement thermique à 50 °C pendant 30 min, suivi d'un traitement acide à pH 2,0 pendant 5 min par ajout d'un tampon acide à pH 2,0 (volume/volume). Les suspensions de biofilms et leurs dilutions ont été par la suite déposées sur le milieu gélosé GVPC (Oxoid, France) et incubées à 37°C pendant 5 jours.

III.5.2 Isolats cliniques et souches de référence

Des isolats cliniques ont été utilisés comme des contrôles lors des différents tests. Ces isolats cliniques ont été fournis par le centre national de référence des légionelles (Bron, France) : *Legionella (L) pneumophila* séro groupe 1 (Lens, Paris, Lorraine), *L. pneumophila* ATCC 35096 (sg 8) et ATCC 33155 (sg 3), *L. anisa* G12108, *L. longbeachae* ATCC 35096, *L. micdadei* ATCC 33218 et *L. taurinensis* ATCC 700508. Le mutant *dotA* obtenu à partir de la souche Lens présente un caractère non virulent et non cytotoxique vis-à-vis de l'amibe *Acanthamoeba* (Ferhat *et al.*, 2009). Ces légionelles ont été cultivées sur le milieu solide BCYE (buffered charcoal yeast extract (BCYE) ou dans le milieu liquide BYE (Oxoid, France). La souche *Escherichia coli* DH5 a été cultivée sur le milieu

solide Luria-Bertini (Miller, 1992) à 37°C et la souche *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* IL1403 sur le milieu solide M17 à 30°C (Terzaghi et Sandine, 1975).

III.5.3 Caractérisation phénotypique des isolats

III.5.3.1 Criblage macroscopique

Les colonies bactériennes qui se sont développées sur le milieu GVPC ont été observées sous une loupe binoculaire pour caractériser la taille, la forme, l'aspect et la couleur de ces colonies. Les colonies ont également été observées sous la lumière UV transmise par la lampe de Wood, afin de contrôler une éventuelle émission de fluorescence. En effet, certaines espèces de légionelles sont capables d'une auto-fluorescence naturelle bleue (*L. anisa*) ou jaune-verte (*L. longbeachae*). Après ce premier stade d'identification des légionelles, les colonies isolées sont mises en suspension dans des tubes de conservation avec billes (2 tubes par isolat environnemental) puis conservées à -20°C et -80°C.

Des aliquotes de ces stocks légionelles potentielles sont utilisés pour obtenir de nouvelles cultures bactériennes sur une gélose BCYE, et subissent ensuite d'autres analyses pour confirmer l'identification.

III.5.3.2 Criblage par culture sur BCYE sans L-cystéine

Les légionelles potentielles sont testées quant à l'auxotrophie pour la L-cystéine ; la technique des « patchs » des colonies bactériennes sur milieu BCYE, permet d'obtenir, après incubation à 30°C pendant 4 ou 5 jours, suffisamment de biomasse bactérienne pour répliquer ces patchs bactériens sur une série de boîte de Pétri contenant différents milieux d'analyse, tels que BCYE et BCYE dépourvu de L-cystéine. C'est la technique de « réplification par tampons de velours » qui a été utilisée. Les boîtes d'analyse sont ensuite incubées à 30°C pendant 4 à 5 jours. Seules les colonies qui ne se sont pas développées sur le BCYE sans L-cystéine, mais capables de croître sur BCYE, ont été conservées pour la suite de l'identification.

III.5.3.3 Criblage par la température d'incubation

Les souches isolées ont aussi été répliquées sur différentes boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé BCYE afin de tester la croissance bactérienne à différentes températures : 18°C, 22°C, 30°C, 37°C, 45°C. Après 4 à 5 jours d'incubation, les souches sont classées selon leur aptitude à croître à ces températures d'incubation.

III.5.3.4 Criblage par le test catalase

Un test de l'activité catalase a été effectué sur les souches isolées. Les colonies ont été mises en suspension dans 15 µl de H₂O₂ (10 volumes) déposés sur des lames de verre. L'intensité de dégagement d'oxygène sous forme de bulles de gaz a été comparée à celle d'une souche catalase + (*E. coli*) et une souche catalase - (*Lactococcus lactis*). Le témoin positif *E. coli* est caractérisé par un dégagement gazeux immédiat, il est noté phénotype Cat⁺⁺. Bien que *L. pneumophila* possède deux gènes, *katA* et *katB*, codant pour la catalase, le dégagement de bulles est extrêmement faible et très tardif, environ après 1 à 2 min de contact bactéries/H₂O₂. Le phénotype est noté Cat⁺ pour les souches *Lp1* Lens, *Lp1* Paris *Lp1* Lorraine ainsi que *L. pneumophila* ATCC 35096 (sérogroupe 8) et ATCC 33155 (sérogroupe 3) prises pour témoin ; le témoin négatif (phénotype Cat⁻), *Lactococcus*

lactis ne produit aucun dégagement gazeux même après 3 min de contact des bactéries avec le peroxyde d'hydrogène.

III.5.4 Caractérisation moléculaire des isolats

III.5.4.1 Préparation d'un lysat bactérien

Une aliquote de culture bactérienne sur milieu gélosé BCYE a été mise en suspension dans 40 µl d'eau déminéralisée stérile, puis traitée à 95°C pendant 15 min afin de lyser les bactéries. Le lysat bactérien est centrifugé pendant 8 minutes à 13000 rpm à température ambiante. Le surnageant contenant les protéines et l'ADN total solubles (appelé « extrait bactérien ») est récupéré stérilement, puis transféré dans un tube stérile et conservé à -20°.

III.5.4.2 Amplification de gènes par PCR

Le mélange réactionnel pour chaque réaction de 25 µl comprend : 8,0 µl d'extrait cellulaire ; 12,5 µl de Master Mix DNAzyme II (Finzyme, Thermo-scientifique, France) ; 1,0 µl de chacune des deux amorces à 10 mM et 2,5 µl d'eau Milli Q stérile. 1 µl des ADN chromosomiques purifiés des souches de *L. pneumophila* Lens et Paris ont servi comme matrice d'ADN dans le cas des témoins.

Le tableau 9 résume les conditions PCR pour réaliser l'amplification des gènes ciblés.

Tableau 9 : Gènes amplifiés, amorces et conditions de mise en œuvre de la PCR

gène	Amorce	Séquence de l'amorce*	Référence	Taille amplicon	Conditions PCR
ARN 16S	Leg225	5' AAGATTAGCCTGCGTCCGAT	Yong <i>et al.</i> (2010)	654	94°C 1min 35 cycles : • 94°C 1min • 55°C 1min • 72°C 1min 72°C 8min 14°C hold
	Leg858	5'GTCAACTTATCGCGTTTGCT			
mip	mipLenssens	5'ATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG	Mérault <i>et al.</i> (2011)	607	
	mipLensrev	5' CAACGCTACGTGGCCATA			
lpg1905	lpg1905sens	5'TTGCCTAAAACCTACCACAGAA	Yong <i>et al.</i> (2010)	528	
	lpg1905rev	5'ATGCCGCCCAAATATACC			
lpg774	lpg0774ses	5'TGCTAACCAACCACTATCCCAA	Yong <i>et al.</i> (2010)	155	
	lpg0774rev	5'GTTTCAATAAAAGCGTGCTCCT			
wzm	wzmsens	5'ATGACCTCAATATCCTCAAAAACCTCAG	Mérault <i>et al.</i> (2011)	833	
	wzmrev	5'TTATGCTCCATGTGATGAAATGC			
wzt	wztsens	5'- ATGAGTTGGTCTATTCGTATTGAAAACC	Mérault <i>et al.</i> (2011)	1425	
	wztrev	5'- TTACTTTTCAGTACTAAATTCATGCTCTTTT			

* Les amorces ont été dessinées d'après la séquence génomique de *L. pneumophila* Paris et présente un Tm de 60 à 61°C

III.5.4.3 Séquençage : Contrôle et purification des amplicons pour le séquençage

Les réactions PCR de 25 µl contenant un amplicon du gène *mip* ont été concentrées par centrifugation sous vide dans un système « Speed Vac » puis déposées sur un gel d'agarose à 8% contenant du SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, S33102) à raison de 3µl pour 50 ml de gel d'agarose. Après une migration sous 75 volts, la taille du fragment d'ADN est contrôlée par comparaison avec la migration d'un mélange de fragments standards (GeneRuler 1kb DNA ladder, Fermentas SM0311). Les fragments d'ADN sont révélés sous lumière bleue (Sybr Safe). Le fragment d'ADN amplifié est ensuite purifié à partir de la bande de gel d'agarose selon le protocole du kit de purification (GeneClean Turbo, MP Biochemicals). Brièvement une bande de gel d'agarose contenant l'ADN est incubée pendant 5 minutes à 55°C dans 500 µl de la solution GENCLEAN. Ce mélange est ensuite transféré sur une colonne de filtration « Genclean Turbo Cartridge », puis centrifugé à 14000 g pendant 5 secondes. 500 µl de la solution de lavage Genclean sont ensuite

déposés de nouveau sur la colonne, puis l'ensemble est centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. L'ADN fixé sur la colonne est alors élué par 30 µl de solution d'élué ou d'eau Milli Q. L'éluat est ensuite conservé à -20°C ou envoyé pour séquençage.

Le séquençage a été réalisé par la société GATC Biotech SARL (Mulhouse, France).

III.5.4.4 Analyse de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

L'analyse PFGE a été réalisée au Centre National de Référence des Légionelles (CNRL) à Lyon. Pour extraire l'ADN total bactérien, les souches de *Legionella* ont été remises en suspension dans le tampon TE (10 mM Tris-HCl et 1 mM EDTA, pH 8) puis traitées par la protéinase K (50 µg/mL) pendant 24 h à 55°C. L'ADN a ensuite été digéré par 20 U de l'enzyme de restriction *Sfi*I (Boehringer Mannheim, Meylan, France) pendant 16 h à 50°C. Les fragments d'ADN ont ensuite été séparés dans un gel d'agarose à 8% préparé dans le tampon 0,5× Tris-borate-EDTA (pH 8,3). La migration a été réalisée dans ce même tampon à l'aide de l'appareil « contour-clamped homogeneous field apparatus » (CHEF DRII system ; Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) sous un voltage constant de 150 V. Les migrations ont été effectuées à des temps d'impulsion constants (25 s) à 10°C pendant 11 h, puis à des temps d'impulsion croissants (35 à 60s) à 10°C pendant 11 h. Les pulsotypes qui diffèrent de trois fragments de restriction au maximum sont considérés comme identiques.

III.5.5 Caractérisation immunologique

La caractérisation immunologique a été réalisée à l'aide de kits d'agglutination Latex. Ces tests permettent de différencier l'espèce *pneumophila* d'autres espèces de légionelles, et de déterminer le sérotype parmi 14 sérotypes de l'espèce *pneumophila*.

III.5.5.1 Caractérisation immunologique par le kit Legionella Latex Test (Oxoid, DR0800M)

Ce kit fourni par la société Oxoid, contient 3 réactifs spécifiques contenant des particules de latex bleu sensibilisées par des anticorps de lapin spécifiques réagissant avec :

- Les antigènes de *L. pneumophila* sg1 pour le premier réactif ;
- Les antigènes de *L. pneumophila* sg2-14 pour le deuxième réactif. Ce réactif ne permet pas de faire la distinction entre ces 13 sérotypes ;
- Les antigènes groupés de 7 espèces de légionelles : *anisa*, *bozemanii*, *dumoffii*, *gormanii*, *longbeachae*, *jordanis*, *micdadei*. Ce réactif ne permet pas de distinguer les espèces.

Les tests d'agglutination Latex ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, une goutte de réactif est déposée sur un cercle de la carte de réaction fournie dans le kit. Une goutte de la suspension de tampon est ajoutée sur le même cercle sans qu'elle soit mélangée avec le réactif. A l'aide d'une öse, une colonie de la souche à caractériser (d'au moins 1 mm de diamètre) est prélevée puis émulsionnée dans le tampon et enfin mélangée au réactif par un mouvement de rotation circulaire pendant 1 minute au maximum. L'agglutination témoigne d'une réaction positive.

III.5.5.2 Caractérisation immunologique par le kit SLIDEX® Legionella Kit - référence 73120 (bioMérieux)

Ce test fournis par la société bioMérieux (bioMérieux, Craonne, France) est complémentaire du test réalisé avec le kit Oxoid car il permet d'identifier individuellement tous les

sérogroupe de 1 à 15. Les réactifs de ce kit contiennent des particules de latex bleues sensibilisées par des anticorps de lapin spécifiques réagissant spécifiquement avec chacun des sérogroupe 1 à 14. Il est réalisé selon le même mode opératoire que celui du kit Oxoid.

III.5.6 Estimation du pouvoir de virulence des légionelles vis à vis de l'amibe *A. castellanii*

III.5.6.1 « Amoeba Plate test »

L'objectif de ce test est de quantifier la virulence des isolats environnementaux de légionelles vis-à-vis d'une amibe de l'environnement, *Acanthamoeba castellanii* qui est un hôte naturel des légionelles virulentes. *Acanthamoeba* est souvent utilisée comme hôte pour ce type de test de virulence et permet de cribler rapidement un grand nombre de légionelles (Moffat et Tompkins, 1992).

III.5.6.1.1 Préparation d'une culture d'*A. castellanii*

Une flasque contenant 21 ml du milieu PYG mélangé avec de la pénicilline et de la streptomycine estensemencée par 1 ml d'une pré-culture de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* effectuée dans le même milieu (tableau 10) Cette flasque est ensuite incubée pendant 5 jours à 30°C pour la multiplication des amibes qui adhèrent au fond du flacon.

Le PY est un milieu utilisé pour la culture des amibes et composé comme suit : protéose peptone à 2%, extrait de levure à 0,1%, MgSO₄ à 4 mM, CaCl₂ à 0,4 M, sodium citrate dihydrate à 0,1%, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O à 0,05 mM, NaH₂PO₃ à 2,5 mM, K₂ HPO₃ à 2,5 mM.

Tableau 10 : Composition du milieu de culture pour le repiquage des amibes

	Volume du milieu de culture			
	7 ml	21mL	30 ml	50 ml
PY	7 ml	21mL	30 ml	50 ml
Glucose 20%	637 µl	1,9 ml	4,55	9,1 ml
Pénicilline/streptomycine*	70 µl	210 µl	300 µl	500µl

* mélange (volume à volume) d'une solution de pénicilline G (10 000 unités /ml) et d'une solution de streptomycine (10 mg/ml).

Pour décoller les amibes adhérentes au fond du flacon, ce dernier est déposé sur un tapis de glace pendant 10 min. Ainsi, les amibes peuvent être remises en suspension par de simples retournements du flacon, et une aliquote (50 µl) est prélevée et déposée sur une cellule de Malassez pour dénombrer les cellules amibiennes par observation sous un microscope. La densité de la culture amibienne est en général proche de 1.10⁶ cellules/ml. Pour atteindre une densité 2,5 à 3.10⁶ c/ml, la culture amibienne est centrifugée pendant 10 min à 2000 rpm et 4°C. Le surnageant de culture est éliminé et le culot de cellules amibiennes est ensuite repris dans le volume de PYG frais (sans antibiotique) requis pour atteindre la concentration cellulaire recherchée.

La suspension d'amibes est ensuite étalée à la surface du milieu gélosé BCYE préparé dans deux boîtes de Pétri carrées de (12 cm x 12 cm) à raison de 3,5 ml de suspension d'amibes par boîte. Après étalement de la suspension amibienne à l'aide d'un râteau stérile, les boîtes sont partiellement séchées pendant 1 h sous le poste de sécurité microbiologique (PSM).

III.5.6.1.2 Préparation des cultures de légionelles

Une aliquote de suspension de légionelles stockée à -20°C dans des cryotubes est déposée à la surface du milieu gélosé BCYE en boîte de Pétri, puis incubée à 30 °C pendant 5 jours.

De la biomasse bactérienne qui s'est développée sur le milieu BCYE est prélevée à l'aide d'une öse et remise en suspension dans 1 ml d'eau déminéralisée stérile. Des dilutions décimales (jusqu'à 10⁻⁶) en eau déminéralisée stérile de cette suspension bactérienne sont réalisées dans des microplaques de 96 puits à l'aide de multi-pettes. Trois µl des suspensions bactériennes et leurs dilutions sont ensuite déposées à la multi-pette à la surface du milieu BCYE avec ou sans tapis amibien et incubées à 30°C. Les lectures de développement des spots bactériens sont effectuées à J+3, J+5 et J+7 et la virulence est quantifiée par le nombre de colonies bactériennes qui se sont développées au sein des spots de dépôt de 3 µl.

III.5.6.2 Test de virulence des légionelles en milieu liquide

L'objectif de ce test est également de quantifier la virulence des isolats environnementaux mais dans des conditions qui sont plus proches des conditions « naturelles », c'est-à-dire dans un environnement liquide. Cette quantification de la virulence des légionelles est effectuée de deux façons différentes :

- par la quantification des légionelles cultivables libérées après la lyse amibienne ;
- par la quantification de la cytotoxicité de *Legionella* en estimant le pourcentage d'amibes mortes par une méthode colorimétrique au bleu d'Alamar (cf. ci-dessous)

III.5.6.2.1 Préparation de la suspension amibienne

La suspension amibienne est préparée de façon similaire à celle décrite pour « l'Amoeba plate test » mais à la concentration finale est de 5x10⁶ amibes/ml. Cette suspension d'amibes est ensuite déposée dans les 24 puits d'une plaque de culture cellulaire à raison de 1 ml par puits qui est ensuite incubée pendant 2 h à 30°C pour permettre l'adhérence des amibes.

III.5.6.2.2 Préparation des suspensions de légionelles

Les suspensions de légionelles sont préparées de façon similaire à celle décrite pour « l'Amoeba plate test » mais à la concentration finale est de 25 x 10⁶ légionelles/ml.

III.5.6.2.3 Infection d'Acanthamoeba par les légionelles en milieu liquide

Après la phase d'adhérence des amibes dans les puits de la plaque, 4 lavages successifs des puits sont effectués à raison de 1 ml de milieu PY pour chaque puits, ce qui permet d'éliminer des traces d'antibiotiques du milieu de culture initial. Puis, 1 ml de suspension de légionelles contenant 25 x 10⁶ légionelles est ajouté à chaque puits, ce qui correspond à une MOI de 5.

La plaque contenant le mélange amibes-légionelles est centrifugée à 2000 rpm pendant 10 min pour réaliser une adhérence simultanée des légionelles aux amibes. Puis, elle est incubée pendant 1 h à 30°C ce qui correspond à la phase d'infection des amibes. Quatre lavages avec du PY (sans antibiotiques) sont de nouveau effectués pour éliminer les légionelles extracellulaires qui n'ont pas infecté les amibes. La plaque est enfin incubée à 30°C pendant 2 jours ; la quantification des légionelles extracellulaires libérées et des amibes infectées puis lysées est effectuée à J+1 et J+2.

Dans les expériences de coinfection, les suspensions des deux souches ont été introduites dans les puits à la même concentration pour aboutir au final à une MOI de 5. Après 48 h post

infection, les légionelles extracellulaires ont été ensemencées sur le milieu BCYE aux dilutions 10^{-5} et 10^{-6} . Après 3 jours d'incubation à 30°C, des colonies bactériennes indépendantes ont été récoltées et utilisées pour réaliser des multiplex PCR des gènes *lpg1905* et *wzm*, marqueurs de l'espèce *pneumophila* et du *sg1* de *L. pneumophila*, respectivement.

III.5.6.2.4 Quantification des légionelles extracellulaires après l'infection

100 µl du milieu PY sont prélevés dans chaque puits et des dilutions successives de ces suspensions sont préparées en eau déminéralisée stérile jusqu'à 10^{-6} . 3 µl de chaque suspension et de leurs dilutions sont déposés à la surface d'un milieu gélosé BCYE préparé dans des boîtes de Pétri carrées. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 30°C pendant 3 à 4 jours. La quantification de la virulence est effectuée ensuite par la croissance des colonies légionelles qui se sont développées au sein des spots de dépôt de 3µl sur le BCYE.

III.5.6.2.5 Cytotoxicité de *Legionella*

L. pneumophila est capable de déclencher la mort cellulaire de l'hôte (amibe) au cours de son cycle infectieux. Le bleu Alamar est un composé de couleur bleue qui est réduit par des enzymes redox des cellules vivantes, ce qui génère une couleur rose. L'activité de ces enzymes est le reflet d'une activité métabolique et donc de la viabilité des cellules. L'intensité de la couleur rose est donc proportionnelle à la viabilité des cellules.

Après 4 lavages des puits contenant des amibes infectées par des légionelles, 100 µl d'une dilution au dixième du bleu Alamar sont ajoutés dans chaque puits. Après 24 h d'incubation à 30°C, l'absorbance est mesurée à 570 et 600 nm par un lecteur de plaques (marque µQuant). Pour une souche donnée, le test est effectué sur plusieurs puits. Le degré de cytotoxicité (en pourcentage) d'une souche virulente de légionelle a été calculé selon la formule suivante :

$$1 - [(DO570 \text{ moyenne} - DO600 \text{ moyenne}) / (DO570 \text{ moyenne Témoin non infecté} - DO600 \text{ moyenne Témoin non infecté})] \times 100$$

III.5.7 Traitements biocides

III.5.7.1 Souches bactériennes

A J-5 des traitements biocides les souches bactériennes isolées lors de cette étude et appartenant au *sg1* de *L. pneumophila* ont été ensemencées sur milieux BCYE, puis incubées à 36°C.

Le jour de l'essai, ces souches ont été suspendues dans de l'eau déminéralisée stérile contenant 0,6% de NaCl. Le milieu de culture choisi pour ces essais a été ensemencé par les souches bactériennes à raison de 10^8 UFC/ml. Ce milieu a ensuite été soumis aux traitements appropriés.

III.5.7.2 Traitements biocides

L' H_2O_2 (35%, Arkema, France) utilisé pour les traitements des légionelles est conservé à 4°C et à l'obscurité. La solution mère a été diluée dans de l'eau UHQ stérile afin d'obtenir la concentration utilisée lors des traitements.

III.5.7.2.1 Traitement à l' H_2O_2

Des suspensions bactériennes de *L. pneumophila* sg 1 d'une concentration de 10^8 UFC/ml ont été préparées dans des tubes à essais, puis supplémenté d' H_2O_2 afin d'obtenir des concentrations finales de 5, 10 et 20 ppm d' H_2O_2 . Les tubes sont ensuite incubés à 28°C sans agitation.

III.5.7.2.2 Traitement aux UV

Les suspensions bactériennes de *L. pneumophila* sg 1 ont été traitées aux UV pendant 1 h à l'aide d'une lampe UV qui délivre des radiations UV à 60 mJ/cm^2 et à une longueur d'onde de 254 nm (BIO UV, France). Cette lampe a été placée dans un réacteur en INOX d'un volume utile de 80 ml et possédant une entrée et une sortie qui permettent la recirculation de la suspension bactérienne. Cette dernière est assurée à l'aide d'une pompe péristaltique d'un débit de 14 L/h. A ce débit, le volume total de la suspension, qui est de 300 ml, passe 8 fois/min par le réacteur UV. Ce débit de renouvellement permet également l'homogénéisation de la suspension bactérienne tout au long de l'expérience (figure 44).

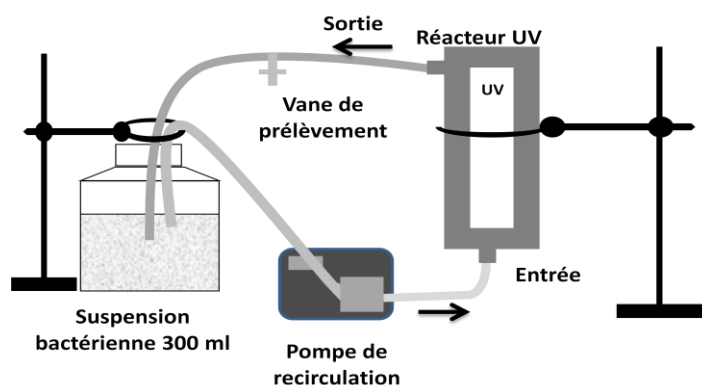
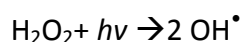


Figure 44 : Schéma de la procédure expérimentale du traitement UV

III.5.7.2.3 Traitement H_2O_2 /UV

III.5.7.2.3.1 Cinétique de dégradation de l' H_2O_2

Sous l'effet des radiations UV, l' H_2O_2 se décompose en radicaux hydroxyles Selon la réaction :



Pour maintenir une concentration stable d' H_2O_2 dans ces conditions, il est donc nécessaire de compenser la consommation d' H_2O_2 par les UV. Pour cela nous avons suivis la cinétique de dégradation de l' H_2O_2 sous l'effet des UV dans les conditions du traitement. Un volume de 300 ml du milieu de culture utilisé lors des traitements a été préparé à 10 ppm d' H_2O_2 puis soumis aux radiations UV. La concentration de l' H_2O_2 a été suivie le long de l'expérience et a permis d'établir une cinétique de dégradation de l' H_2O_2 . Cette cinétique a permis de calculer une vitesse de consommation de l' H_2O_2 , sur laquelle est basé le réglage de la pompe doseuse de l' H_2O_2 lors des

traitements. Un essai préalable a été réalisé pour s'assurer que ce réglage permet de maintenir la concentration à 5 ppm tout au long du traitement.

III.5.7.2.3.2 Traitement des suspensions bactériennes

Pour le traitement des suspensions bactériennes de *Legionella pneumophila* sg 1 à l'H₂O₂/UV, l'H₂O₂ a été ajouté à la suspension bactérienne afin d'obtenir une concentration finale de 5 ppm. Une pompe doseuse permet d'alimenter la suspension bactérienne en H₂O₂ en continu afin de maintenir la concentration du traitement à 5 ppm (figure 45). Les autres conditions expérimentales sont les mêmes que pour le traitement UV, à savoir : le même dispositif expérimental et le même débit de recirculation de la suspension bactérienne.

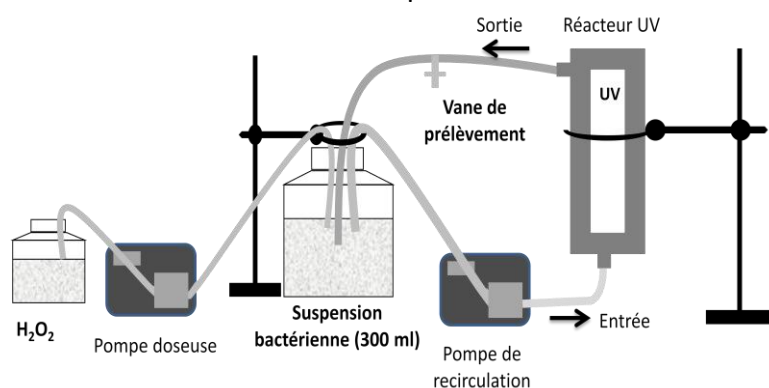


Figure 45 : Schéma de la procédure expérimentale du traitement H₂O₂/UV

III.5.7.3 Mesure de l'effet des traitements biocides

La survie des bactéries sous l'effet des traitements biocides appliqués a été mesurée par culture sur milieu gélosé (BCYE). Les prélèvements ont été effectués avant la mise sous traitement des suspensions bactériennes et après 5, 10, 20, 40 et 60 min de traitement. Les suspensions bactériennes ont été prélevées stérilement, puis diluées dans de l'eau physiologique stérile et étalées sur des boîtes de pétri contenant le milieu BCYE (Oxoid, France). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 5 jours au minimum. La numération des colonies a été effectuée et la cinétique de mortalité (cultivabilité) a été réalisée. Après les traitements, les colonies de *L. pneumophila* sg 1 résistantes ont été collectées dans des cryotubes et conservées à -20°C pour les analyses complémentaires.

III.5.8 Effet des traitements sur le pouvoir pathogène des légionelles

La virulence des souches traitées à différent temps d'exposition (5 min, 20 min et 60 min) aux UV et à l'H₂O₂/UV a été évaluée par mesures de cytotoxicité décrite ci-dessus. La cytotoxicité des souches traitées a été comparée à celle des mêmes souches non traitées et des souches de référence. Le mode opératoire est décrit ci-dessus dans le paragraphe III.5.6.2.5.

III.5.9 Détection des mutations après les traitements UV et H₂O₂/UV

Les colonies des isolats environnementaux résistantes aux traitements biocides H₂O₂/UV et UV seuls ont été collectées dans des tubes de conservations et conservé à -20°C. Pour les amplifications géniques et le séquençage, les souches de *L. pneumophila* sg 1 ont été de nouveau cultivées sur BCYE et une lyse des souches traitées a été effectuée selon la méthode décrite ci-dessus (III.5.4.1). Les PCR et la purification des amplicons des gènes *ARNr 16s*, *mip*, *wzm* et *wzt* ont

été réalisées selon les méthodes décrites ci-dessus puis envoyés à une société pour la réalisation d'un séquençage (GATC Biotech SARL, Mulhouse, France).

III.6 Analyse microbiologiques

III.6.1 Récupération des lames de verre et préparation des suspensions de biofilms

Les lames de verres colonisées par les biofilms ont été prélevées puis remises rapidement dans des flacons stériles contenant 1 ml d'eau physiologique stériles. Les flacons ont été ensuite déposés dans une glacière puis transportés au laboratoire pour la récupération des biofilms.

Les biofilms ont été remis en suspension dans 6 ml (volume total) d'eau stérile par grattage des lames à l'aide d'un grattoir en Inox, stérilisé par trempage dans une solution d'alcool à 90% puis par flambage au bec benzène. Ces suspensions de biofilms ont subi un traitement aux ultrasons pendant 1 minute afin d'altérer les agrégats de biofilms. Le volume total de la suspension de biofilm (6 ml) a été réparti dans des sous échantillons pour l'ensemble des analyses microbiologiques.

III.6.2 Dénombrement des bactéries totales

Cette technique est basée sur le marquage des bactéries par un fluorochrome, le DAPI, après qu'elles aient été récoltées par filtration à partir de l'échantillon. Les bactéries doivent au préalable avoir été perméabilisées par un traitement au formaldéhyde afin que le fluorochrome puisse migrer à l'intérieur. Le DAPI se fixe plus ou moins indifféremment sur les acides nucléiques (ADN) de toutes les cellules, qu'elles aient été vivantes ou mortes avant le traitement de l'échantillon. Les valeurs obtenues à l'aide de cette technique sont celles de la concentration de l'ensemble des bactéries ("bactéries totales").

Le filtre est monté entre lame et lamelle pour être observé sous un éclairage UV à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Cette irradiation amène le DAPI à émettre une lumière de fluorescence bleue là où il s'est fixé. Les bactéries sont ainsi mises en évidence sur un fond noir et peuvent être dénombrées.

Compte tenu de l'hétérogénéité de la distribution des bactéries sur le filtre, un total de 50 champs par filtre est compté et ce pour chacun des trois réplicats de l'échantillon.

Techniquement Un volume de 1 ml de la suspension de biofilm a été mélangé avec 100 µl de formol à 37% (1/10 de volume) puis incubé pendant 48 h au minimum. A l'issue de cette incubation l'ensemble de cette suspension (ou une partie selon l'appréciation de la charge microbienne de la suspension) a été filtrée sur un filtre de polycarbonate d'une porosité de 2 µm. Le filtre a été séché à température ambiante et peut être stocké à -20°C jusqu'au marquage. 10 µl d'une solution du DAPI (10 µg/ml) ont été déposés sur les filtres puis l'ensemble est incubé pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante. L'excès de DAPI a été éliminé par le papier absorbant, le filtre a ensuite été rincé dans l'alcool 70% pendant 30 secondes, séché à température ambiante et monté entre lame et lamelle avec de l'huile à immersion non fluorescente. Les lames sont conservées au congélateur à -20°C jusqu'au dénombrement. Le comptage s'effectue à l'aide du microscope à épi-fluorescence avec l'objectif à immersion (X100) et la combinaison des filtres « UV » aux longueurs d'ondes 334-365 nm. 50 champs par filtre ont été comptés, les bactéries sont caractérisées par une coloration bleue, parfois légèrement grise.

III.6.3 Dénombrement des bactéries totales cultivables

Les bactéries cultivables sont dénombrées par culture sur un milieu solide non sélectif, le TSA (Tryptone Soja Agar) (Fisher Scientifique, France). Plusieurs dilutions sont réalisées à partir de l'échantillon initial puis chacune d'elles est reprise à raison de 100 µl pour inoculer le milieu de culture en boîtes de Pétri. Le dénombrement des colonies est effectué après une incubation de 3 à 5 jours à 25°C.

III.6.4 Mesure de la concentration en ATP

L'ATP est une forme chimique universelle de stockage temporaire de l'énergie des cellules. C'est un indicateur de l'activité globale des bactéries qui dépend tout à la fois de leur concentration mais aussi du degré d'activité de chacune d'entre elles. Pour qu'elle soit significative, l'analyse doit donc être effectuée le plus rapidement possible après l'échantillonnage des biofilms et leur mise en suspension.

L'analyse comporte une phase d'extraction de l'ATP des cellules dont la performance varie en fonction de la nature des échantillons et qui, de ce fait, en constitue le point faible lorsqu'une comparaison doit être effectuée. La phase de dosage proprement dite fait appel à une réaction de chimiluminescence et mesurée à l'aide d'un luminomètre (CL 300, Biorad, France).

Le dosage de l'ATP est effectué, à l'aide d'un kit optimisé au laboratoire CARRTEL, directement après la mise en suspension des biofilms afin de conserver la totalité de l'ATP. Un volume de la suspension du biofilm est filtré sur des filtres en polycarbonate de 2 µm de porosité. Le volume filtré dépend de l'appréciation de la charge microbienne des biofilms. La membrane est déposée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, contenant 150 µl d'extractant (confidentiel). L'ensemble est ensuite mélangé puis incubé pendant 10 min. A l'issue des 10 min d'extraction, 150 µl de neutralisant (confidentiel) ont été ajoutés et l'ensemble est de nouveau incubé pendant 2 min. 150 µl d'extrait sont prélevés et mis en contact avec 15 µl du réactif LL (Luciférine-luciférase) et une première lecture a été effectuée à l'aide d'un luminomètre. 10 µl d'ATP standard sont ajoutés et une deuxième lecture est effectuée. Le calcul de la concentration de l'ATP dans l'échantillon se fait sur la base de la quantité d'ATP standard ajoutée.

III.6.5 Dénombrement des bactéries de l'espèce *L. pneumophila* ("*Lp* totales") par immunofluorescence

Comme pour la technique de dénombrement de l'ensemble des bactéries (technique du DAPI), les échantillons sont tout d'abord fixés par du formaldéhyde puis filtrés pour récolter les bactéries sur une membrane. Elles sont alors mises en contact avec une solution d'un anticorps fluorescent anti-*L. pneumophila*. Après quelques dizaines de minutes d'incubation, l'anticorps s'est fixé sur les antigènes qui lui correspondent s'ils sont présents. Le filtre est alors mis à sécher à l'air puis placé entre lame et lamelle pour être observé sous éclairage UV à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Les bactéries sur lesquelles l'anticorps s'est fixé émettent une fluorescence verte. La technique amène donc au dénombrement spécifique de l'ensemble des bactéries de l'espèce *L. pneumophila*, vivantes ou mortes, tant que leurs membranes cellulaires conservent un certain degré d'intégrité et qu'elles soient cultivables ou non.

Ce dénombrement comporte également deux étapes, une étape de fixation commune avec celle du comptage des bactéries totales. Après 24 h (ou 48 h maximum) de fixation, un volume de la suspension a été filtré sur un filtre de polycarbonate blanc d'une porosité de 2 µm. le filtre a été séché puis placé sur une lame recouverte de parafilm. 10 µl du réactif de coloration anti-*Legionella*

pneumophila de (MONOFLUO) ont été déposés sur le filtre de façon à le recouvrir. La lame a été placée dans une chambre humidifiée et incubée pendant 45 min à 37°C. L'excès de réactif de coloration a été éliminé par un papier absorbant et le filtre a été rincé dans du PBS. Le filtre a ensuite été séché à l'air puis placé entre lame et lamelle dans une goutte de Citifluor. Le dénombrement a été effectué à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence avec l'objectif (X100) à immersion et la combinaison des filtres «CTC». 50 champs par filtre ont été comptés, *L. pneumophila* se présente sous forme de bâtonnets verts.

III.6.6 Dénombrement des formes cultivables de *L. pneumophila*

III.6.6.1 Par culture sur milieu solide spécifique

La recherche des formes cultivables de *L. pneumophila* a été effectuée selon la norme AFNOR NF T90-431 appliquée ici aux biofilms mis en suspension. La technique tient sa spécificité de la composition du milieu de culture (GVPC) mais également de deux prétraitements appliqués aux échantillons : un traitement thermique à 50 °C pendant 30 min et un traitement acide à pH 2 pendant 5 min, visant à éliminer les bactéries autres que *L. pneumophila* qui pourraient se développer sur le milieu. L'incubation est de 10 jours à 37°C avec des observations des boîtes à partir de 3 ou de 4 jours.

III.6.6.2 Par séparation immuno magnétique (IMS)

La technique IMS (Immuno magnetic separation) est basée sur la capture sélective des bactéries en se basant sur leurs propriétés antigéniques. La méthode permet théoriquement la capture des cellules présentant l'épitope ciblé par l'anticorps utilisé (Riffard *et al.* 2001). Des anticorps anti-*Legionella* fixés sur des billes magnétiques sont introduits dans l'échantillon liquide à analyser (figure 46). Les anticorps se lient alors spécifiquement aux légionelles présentant l'épitope ciblé par l'anticorps utilisé. L'anticorps anti *Legionella* utilisé dans cette étude est un anti LPS : DP-Lp1-O2 qui appartient au « Dresden Legionella MAb panel » (Allegra *et al.* 2011).

Dans l'étape suivante, les complexes billes-anticorps-*Legionella* sont regroupés sur le coté du tube à l'aide d'un aimant et le liquide contenant les autres bactéries est éliminé. On procède ensuite à plusieurs rinçages en retenant à chaque fois les billes et les légionelles contre la paroi du tube grâce à l'aimant. Dans une dernière étape, une solution tampon stérile est introduite dans le tube et on éloigne l'aimant pour remettre en suspension les billes et les légionelles qu'elles supportent. La suspension a été utilisée ici pour inoculer des milieux de culture solides sélectifs (BCYE et GVPC) pour le dénombrement des légionelles cultivables (figure 46).

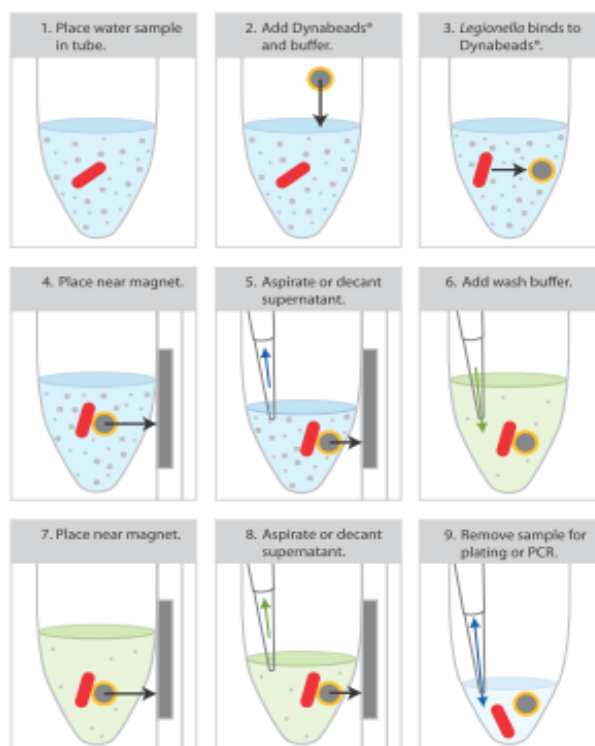


Figure 46 : Séparation immuno magnétique des légionelles (source : Invitrogen)

1 ml de chaque suspension de biofilm a été déposé dans un tube Eppendorf contenant 50 μl de billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-*Legionella* à 4×10^8 particules/ml. Les tubes ont été par la suite incubés sous agitation modérée pendant 2 h à température ambiante. Les complexes billes magnétiques-anticorps-bactéries ont été groupés sur le côté du tube à l'aide d'un support magnétique (DynaL MPC-M magnetic particle concentrator, Dynal, France) et le surnageant a été enlevé. Ces complexes ont été lavés deux fois par 1 ml d'eau stérile à pH 7 puis remis en suspension dans 1 ml d'eau stérile. Les échantillons obtenus ont été déposés sur les boîtes de Pétri contenant du BCYE α et du GVPC en raisons de 100 μl par boîte. Ces boîtes ont été incubées à 37°C pendant 10 jours.

III.6.7 Dénombrement des amibes

Les échantillons sont constitués à partir du biofilm qui a été remis en suspension. Pour conserver l'intégrité des amibes, la fixation est réalisée par ajout d'une solution saturée de bichlorure de mercure (320 μl d' HgCl_2 par 1ml d'échantillons). Après décantation d'une nuit en cuve Utermöhl, le dénombrement est effectué sous microscope inversé à l'aide de l'objectif x100.

III.6.8 Récapitulatif des indicateurs analysés et des techniques utilisées

Le tableau 11 dresse la liste des indicateurs pris en compte dans l'ensemble des études de performances des biocides testés.

Tableau 11 : Liste des indicateurs pris en considération et des techniques employées

Types d'indicateurs	Nom détaillés des indicateurs	Techniques d'analyses
physiques et chimiques	température	TRASAR
	conductivité	Sonde conductivité
	ClO ₂	DPD
biologiques	Activité métabolique globale des biofilms	ATP métrie
	Bactéries totales cultivables	Culture sur milieu TSA
	Bactéries totales	Microscopie en épifluorescence après marquage au Dapi
	Légionelles cultivables	Culture sur milieu GVPC
	Légionelles totales	Microscopie en épifluorescence, après marquage par immunofluorescence,
	Amibes	Microscopie inversée en cuve Utermöhl
	Autres protistes	Microscopie en épifluorescence

IV- Isolement et caractérisation de légionelles à partir d'une source environnementale : cas particulier de la source Soufre d'Aix Les Bains

IV. Chapitre IV : Isolement et caractérisation de légionelles à partir d'une source environnementale, cas particuliers de la source « Soufre » d'Aix Les Bains

IV.1 Contexte de l'étude

Afin de reproduire des conditions les plus proches possibles des conditions réelles pour l'étude des effets des biocides, l'évaluation des performances du ClO_2 et de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ a été effectuée sur des biofilms environnementaux. Pour ces études nous avons utilisé la source thermique 'soufre' (S) située à Aix Les Bains dans laquelle nous avons disposé des supports artificiels immergés sur lesquels se sont développés des biofilms. La composition microbiologique de ces biofilms était inconnue mais ils étaient naturellement contaminés par des légionelles et des protozoaires. Les conditions rencontrées dans cette source permettaient un développement de biofilms très rapide et à des concentrations suffisamment élevées pour la mise en évidence d'éventuels effets des biocides.

Avant l'utilisation de la source « S » comme incubateur pour le développement des biofilms, il a été nécessaire de caractériser les légionelles présentes dans cette source.

La source « soufre » d'Aix les Bains est une source thermique qui alimentait les thermes régionaux. Dans les années 80, cette source a été à l'origine d'une quarantaine de cas de légionellose en 10 ans, malgré des mesures de désinfection. Le sérotype 1 de *L. pneumophila* était responsable de 50% des cas de légionellose ; pour les autres cas, étaient impliquées des *Lp3*, *Lp6* et *Lp13* (respectivement 17, 11 et 2%) (Gruber-Duvernay 2001). L'analyse de ces souches par PFGE a révélé qu'elles ne correspondaient à aucune souche clinique répertoriée par le CNRL (Centre Nationale de Référence des Légionelles).

Durant les deux années suivant le second cas de légionellose, une étude a permis d'isoler et de caractériser quatre-vingt une souches de *L. pneumophila* à partir de prélèvements d'eau effectués en différents points des thermes et de trois sources (A, Alum ; P et S, Soufre) alimentant les thermes, (Molmeret *et al.*, 2001). La majorité de ces isolats environnementaux (62) appartenaient au sérotype 3 (*Lp3*), 27 au sérotype 1 (*Lp1*), 9 au sérotype 13 (*Lp13*), 3 au sérotype 6 (*Lp6*), et 1 au sérotype 2 (*Lp2*). Il y avait aussi 26 souches appartenant à l'espèce *dumoffii*. Néanmoins aucun des 81 profils PFGE réalisés à partir des isolats environnementaux n'était identique à l'un des deux isolats cliniques analysés. La source S (Soufre) a permis d'isoler 1 *Lp1* et 3 *Lp3*, caractérisées par des profils PFGE très différents (Molmeret *et al.*, 2001).

Il était intéressant de déterminer 30 ans plus tard, quelles légionelles persistaient dans cet écosystème thermal, et, bien sûr, si des légionelles virulentes étaient toujours présentes dans la source S qui n'alimente plus les thermes. Cette source a aussi servi d'incubateur pour la formation des biofilms utilisés lors des études effectuées dans le cadre du projet Legiosecure. Néanmoins, les études concernant des traitements biocides (Perox) sur les biofilms ne nous ont permis d'isoler que quelques rares légionelles car ces traitements biocides se sont révélés le plus souvent très efficaces. Ce sont les souches isolées après les traitements Perox par la méthode d'immunoprécipitation (IMS) qui ont été incluse dans cette étude. D'autre part, la quantité de légionelles dans le biofilm n'est pas connue, ni les espèces ou sérotypes qui sont présents.

L'objectif de cette étude est l'application d'une approche d'étude originale d'isolement et de caractérisation des légionelles actuellement présentes dans la source 'S' d'Aix-les-Bains ; puisque ces bactéries seront recherchées à partir de biofilms. Ces biofilms se développent sur des lames de verres immergées dans la source S. Ainsi, les légionelles présentes dans ces nouveaux biofilms reflèteront bien la contamination persistante de la source S par les souches de *Legionella* présentes dans des biofilms. De plus, nous étudierons la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis des traitements biocides (Perox) ainsi que leur pouvoir de virulence. .

IV.2 Résultats

IV.2.1 Isolement de souches de *Legionella* et criblage phénotypique

Plusieurs campagnes de prélèvements dans la source S ont été effectuées au cours de l'année 2010 :

- Campagne du mois d'aout : 5 isolats désignés LAXA ;
- Campagne du mois de novembre : 49 isolats désignés LAXB ;
- Campagne du mois de décembre : 188 isolats désignés LAXC ;
- Six autres isolats obtenus après immunoprécipitation spécifique par un anticorps anti LPS : DP-Lp1-O2 qui appartient au « Dresden *Legionella* MAb panel » (Allegra *et al.*, 2011) lors des études de l'efficacité du procédé de traitement PEROX ont été associés à l'étude et désignés Legiosecure (LS). Les souches LS6 et LS8 ont été isolées de biofilms traités à l'H₂O₂/UV à 30 ppm d'H₂O₂ pendant 48 h lors d'un essai de traitement à l'H₂O₂/UV. Les souches LS25, LS26, LS27 et LS28 ont été isolées de biofilms non traités (LS25 et LS26) et de biofilms traités pendant 72 h aux UV (LS27 et LS28) lors d'un même essai de traitement aux UV seules.

L'identification des isolats susceptibles d'appartenir au genre *Legionella* a été effectuée en plusieurs étapes qui sont décrites ci-après.

IV.2.1.1 Observation des colonies sous la loupe binoculaire

Les colonies appartenant au genre *Legionella* sont caractérisées par un aspect en verre fritté et un halot rose, parfois vert. Les colonies ne présentant pas ces caractéristiques ont systématiquement été éliminées.

IV.2.1.2 Test de l'activité catalase

Toutes les espèces de légionelles n'ont pas un phénotype Cat⁺ ; en effet, nous avons testé des légionelles de référence comme *L. anisa* G12108 et *L. micdadei* ATCC 33218 qui présentent un phénotype Cat⁺⁺ comme *E. coli* ; pour *L. longbeachae* ATCC 35096 et *L. taurinensis* ATCC 700508, le phénotype est clairement Cat⁺ (le dégagement gazeux est clair mais moins intense que ceux de *L. anisa* et *E. coli*).

Ainsi, ces résultats suggèrent que le phénotype Cat⁺ est caractéristique de l'espèce *pneumophila* et représente donc un outil très intéressant pour le criblage de notre étude. Aussi, les 25 isolats de la série LAXB et les 188 de la série LAXC présentant un phénotype Cat⁺⁺ ont été éliminés de la suite de l'étude, car non *L. pneumophila*.

IV.2.1.3 Auxotrophie pour la cystéine

Les isolats criblés par les tests macroscopique et l'activité catalase ont été analysés sur le milieu BCYE avec ou sans L-cystéine à l'aide de la technique de « répliation en velours ». Après l'incubation à 35°C pendant 4 jours, seul l'isolat LS8 n'était pas auxotrophe pour la cystéine ; comme cet isolat présentait aussi une activité catalase plus forte que les autres isolats, ces 2 critères l'excluaient définitivement d'une appartenance à *L. pneumophila*.

IV.2.1.4 Températures optimales de croissance

Les isolats retenus ont ensuite été analysés par la méthode de répliation en velours sur les milieux gélosés BCYE à raison de 5 patchs par souches réparties sur 5 boîtes différentes (plusieurs patchs appartenant à des souches différentes par boîte). Puis, chaque boîte de Pétri a été incubée à une température différente : 18, 22, 30, 37, 45°C pendant 4 jours. La croissance des isolats ayant les caractéristiques de *Legionella* est optimale à 30 et 37°C, significativement moins rapide à 22 et 45°C et très lente à 18°C. La croissance des isolats n'appartenant pas au genre *Legionella* est similaire à celle des souches de légionelles à la différence qu'aucune croissance n'a été observée à 45°C pour ces souches.

Ces résultats sont en adéquation avec les données bibliographiques qui indiquent que les légionelles se développent à des températures allant de 20 à 45°C avec un optimum aux alentours de 35°C.

IV.2.2 Criblage immunologique

L'identification immunologique par le test d'agglutination Latex des souches isolées a été réalisée avec deux kits différents mais complémentaires.

Le premier test (Oxoid) a permis de grouper les isolats environnementaux des campagnes de prélèvements du mois d'août et de novembre (LAXA et LAXB) en trois groupes :

- un groupe de 7 isolats appartenant au séro-groupe 1 de *L. pneumophila* (Lp1) ;
- un groupe de 20 isolats appartenant aux séro-groupes 2-14 de *L. pneumophila* (Lp2-14) ;
- et un groupe de 3 isolats qui n'appartiennent pas au genre *Legionella* : LAXB11, LAXA53 et LAXA54.

Les souches LS se répartissent aussi en 3 groupes : Lp1 (3 isolats), Lp2-14 (2 isolats) et un isolat n'appartenant pas au genre *Legionella* (LS8).

Dans un deuxième temps le test d'agglutinations Latex de bioMérieux (SLIDEX® *Legionella* Kit - référence 73120 – bioMérieux) a permis d'identifier les séro-groupes de tous les isolats de *L. pneumophila*. Pour la série LAXB, seuls deux séro-groupes autres que le sg1 (Lp1) sont présents : le séro-groupe 12 qui est majoritaire (15 isolats) et le séro-groupe 10 (3 isolats). Pour les isolats de la série LS qui proviennent de biofilms issus de la même source S, on retrouve les deux mêmes séro-groupes 10 et 12 ; quant à la série LAXA, on retrouve seulement le séro-groupe 10 (2 isolats). L'ensemble des caractéristiques des isolats analysés est présenté dans le tableau 12.

En conclusion, l'ensemble des tests effectués sur 36 isolats a permis de confirmer que 32 isolats sont des *L. pneumophila* : 10 Lp1, 6 Lp10 et 16 Lp12. Le typage reste indéfini pour quatre isolats seulement : LAXB11, LAXA53, LAXA54 et LS8 (tableau 12).

Tableau 12 : Caractérisation physiologique, biochimique et immunologique des isolats environnementaux de la source soufre

	36 Isolats	Croissance			Tests immunologiques		Bilan
		BCYE	BCYE -cyst	Activité catalase	Oxoid	bioMérieux	
Série LAXB nov, 2010	1	+	-	-	Lp2-14	Lp10	32 isolats 6 Lp1 3 Lp10 15 Lp12
	2	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	3	+	-	-	Lp2-14	Lp10	
	4	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	5	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	6	+	-	-	Lp1	Lp1	
	7	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	8	+	-	-	Lp1	Lp1	
	9	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	10	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	11	+	-	-	Nd*	Nd*	
	12	+	-	-	Lp1	Lp1	
	13	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	14	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	15	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	16	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	17	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	18	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	19	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	20	+	-	-	Lp2-14	Lp10	
	21	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	22	+	-	-	Lp1	Lp1	
	23	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	24	+	-	-	Lp1	Lp1	
	25	+	-	-	Lp1	Lp1	
Série LAXA aout 2010	21	+	-	-	Lp1	Lp1	1 Lp1 2 Lp10
	22	+	-	-	Lp2-14	Lp10	
	23	+	-	-	Lp2-14	Lp10	
	53	+	nd	-	nd*	nd*	
	54	+	nd	-	nd*	nd*	
Legiosecur (LS) juin-sept 2010	6	+	-	-	Lp2-14	Lp10	3 Lp1 1 Lp10 1 Lp12
	8	+	+	++	nd*	nd*	
	25	+	-	-	Lp2-14	Lp12	
	26	+	-	-	Lp1	Lp1	
	27	+	-	-	Lp1	Lp1	
28	+	-	-	Lp1	Lp1		
Isolats cliniques (référence)	Lp1 Lens	+	-	-	Lp1	Lp1	
	Lens dotA	+	-	-	nd	nd	
	Lp1 Paris	+	-	-	Lp1	Lp1	
	Lp1 Lorraine	+	-	-	Lp1	Lp1	
	L. anisa	+	-	++	L	L. anisa	
	L. longbeachae	+	-	+	L	L. longbeachae	

*nd : Pas de réaction Latex

Sur l'ensemble des isolats environnementaux le sérotype 12 est donc majoritaire et représente 44.4 % des isolats alors que le sérotype 1 en représente 27.8 % et le sérotype 10, 16.7 % (tableau 13).

Tableau 13 : Bilan de la classification en sérogroupes de *L. pneumophila*

Sérogroupe (sg)	sg 1	sg 10	sg 12	non <i>Legionella</i>
Souches LAXB	24%	12%	60%	4%
Souches LAXA	20%	40%	0%	40%
Legiosecure (LS)	50%	16.7%	16.7%	16.7%
Nombre d'isolats	10	6	16	4

IV.2.3 Criblage moléculaire

IV.2.3.1 PCR: polymerase chain reaction

La première étape du criblage moléculaire a été réalisée par l'amplification de deux gènes très utilisés pour le typage moléculaire du genre *Legionella* : *ARNr 16S* et *mip* (Ratcliff *et al.*, 1998). Le gène *mip* code pour une protéine de la membrane externe avec une activité peptidylprolyl cis/trans isomérase importante dans le cycle infectieux de *Legionella* et dont la taille comprend de 232 à 251 acides aminés selon les espèces de légionelles. Le gène *mip* est stable, retrouvé chez toutes les espèces de légionelles et présente une zone hypervariable de 51 pb, située immédiatement en aval de la région en 5' codant pour la séquence signal (Ratcliff *et al.*, 1998).

Les gènes *mip* et *ARNr 16S*, ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques au genre *Legionella*, dont les séquences ont été dessinées à partir des génomes de souches cliniques séquencées (Yong *et al.*, 2010). Seuls les isolats LAXA53 et LAXA54 n'ont pas permis l'amplification du gène codant pour l'*ARNr 16S* ce qui confirme leur non appartenance au genre *Legionella* qui avait déjà été suggérée par les résultats des tests immunologiques. L'utilisation d'un autre jeu d'amorces a permis d'obtenir des fragments d'ADN par amplification PCR ; la séquence de ces fragments correspond aux gènes *ARNr 16S* de *Mycobacterium*.

Les deux marqueurs génétiques, *mip* et *ARNr 16S* ne permettant pas une différenciation des espèces et sérogroupes de légionelles, nous avons utilisé d'autres marqueurs génétiques proposés par Yong *et al.* (2010). Le principe repose sur l'amplification en PCR multiplex de gènes spécifiques du genre *Legionella* (*ARNr 16s*), de l'espèce *pneumophila* (*lpg1905*) et du sérogroupe 1 de l'espèce *pneumophila* (*lpg0774*). Le gène *lpg0774* (155 pb) code pour une protéine impliquée dans la biosynthèse du LPS (Lipopolysaccharide) et *lpg1905* (528 pb) pour une ecto-NTPDase. Les résultats que nous avons obtenus ont parfois été contradictoires ; ainsi, pour certains isolats, l'amplification du gène *lpg0774* était positive alors que celle du gène *lpg1905* était négative. Or, les isolats possédant le gène *lpg0774* appartiennent au sérogroupe 1 de *L. pneumophila* et devrait posséder également le gène *lpg1905*. La PCR multiplex réalisée dans les conditions décrites par Yong *et al.* (2010) ne nous a pas permis de différencier les isolats d'une façon rigoureuse, certainement à cause de nos conditions multiplex.

Nous avons donc abandonné l'approche de PCR multiplex, et, en gardant les amorces décrites par Yong *et al.* (2010), nous avons effectué des PCR indépendantes et validé cette méthode en y associant des souches cliniques de *Legionella* déjà caractérisées.

Le gène *ARNr 16S* a été amplifié avec les amorces LEG225 et LEG858 spécifiques des séquences du genre *Legionella* (Yong *et al.*, 2010) (figure 47).

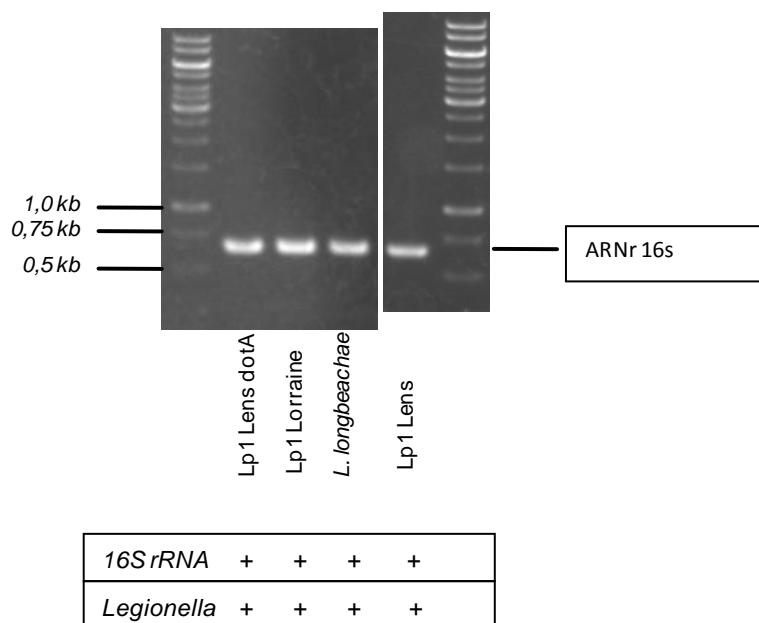


Figure 47 : Résultats de l'amplification du gène ARNr16S

Le gène codant pour l'ARNr 16S a été amplifié chez tous les isolats cliniques appartenant au genre *Legionella*. Ce gène amplifié avec les amorces définies par Yong *et al.* (2010) constitue donc un marqueur fiable du genre *Legionella*.

Le gène *lpg1905* a été amplifié avec des amorces (1905sens, 1905rev) spécifiques des séquences de l'espèce *L. pneumophila* (Yong *et al.*, 2010).

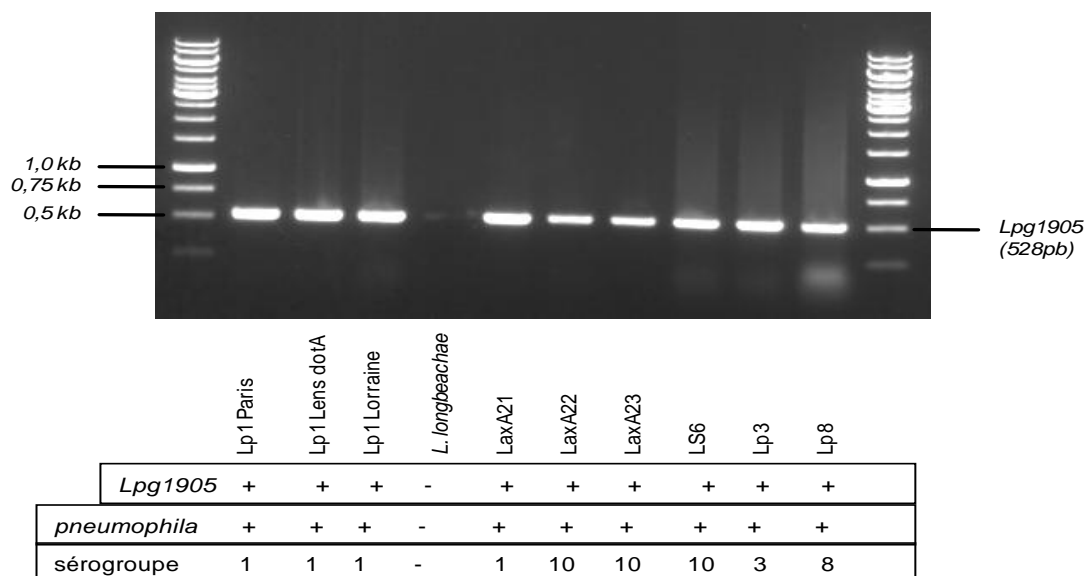


Figure 48 : Résultats de l'amplification du gène *lpg1905*

Le gène *lpg1905* est amplifié quel que soit le sérogroupe de *L. pneumophila* testé (sg 1, sg 3, sg 8 et sg 10) (figure 48). Il n'a pas été amplifié avec la souche *L. longbeachae*. Ce gène est donc un marqueur fiable de l'espèce *pneumophila*.

Le gène *lpg0774* est un marqueur du sérogroupe 1 de *L. pneumophila* d'après Yong *et al.* (2010) avec les amorces 0774sens et 0774rev.

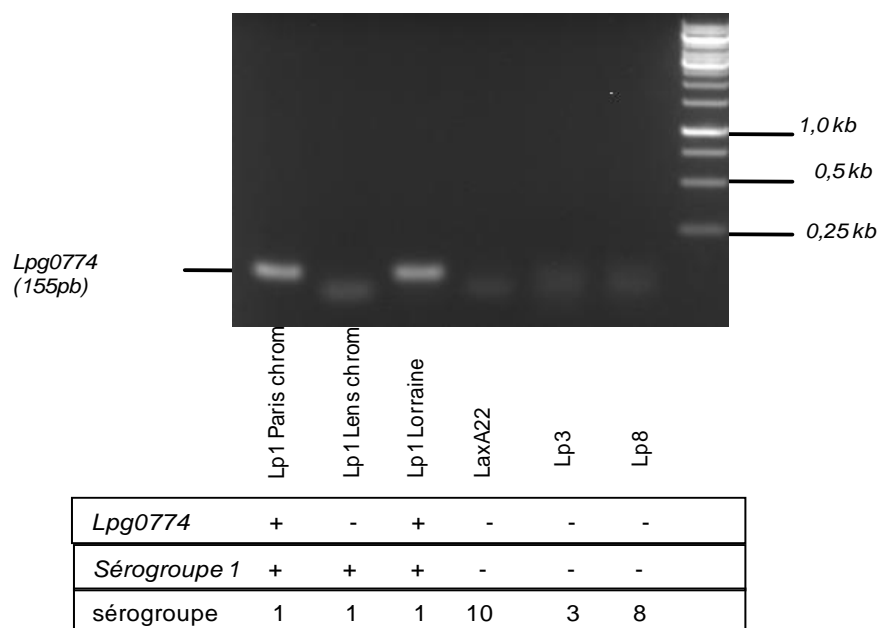


Figure 49 : Résultats de l'amplification du gène *lpg0774*

Ce gène n'a pas été amplifié chez la souche *L. pneumophila* Lens et ne semble donc pas constituer un marqueur fiable du sérogroupe 1 dans les conditions de nos réactions PCR (figure 49). La réaction PCR a été réalisée deux fois avec deux extraits chromosomiques différents de la souche *L. pneumophila* Lens et les deux essais aboutissent aux mêmes résultats.

Deux autres gènes, *wzm* et *wzt*, sont décrits comme marqueurs du sérogroupe 1 de *L. pneumophila* (*Lp1*) par Méréault *et al.* (2011). Ces gènes appartiennent à la région génétique *lps* qui code pour un ABC transporteur spécifique du sg1. Nous avons amplifié par PCR le gène *wzm* en duplex avec le gène *mip* chez des souches caractérisées (figure 50).

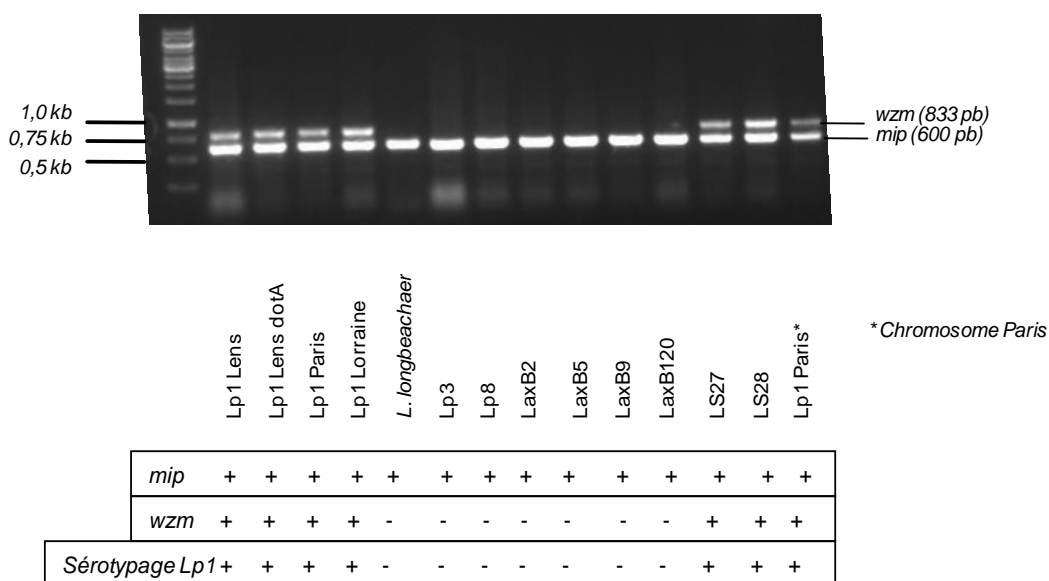


Figure 50 : Résultats de l'amplification des gènes *mip* et *wzm* en multiplex PCR

Les PCR effectuées avec les amorces du gène *wzm* permettent bien d'obtenir un seul amplicon de taille attendue (environ 800 pb) chez toutes les souches appartenant au sg 1 de

L.pneumophila ; aucun amplicon n'est obtenu avec des souches d'autres sérogroupes ou d'autres espèces de légionelles. Le gène *wzm* est donc un marqueur fiable du sg 1 (même en duplex PCR). De plus, l'obtention d'un seul amplicon de 600 pb pour le gène *mip* confirme que toutes ces souches appartiennent au genre *Legionella*.

Suite à ces vérifications, nous avons réalisé des amplifications par PCR individuelles des gènes *lpg1905* et *lpg0774* et des PCR duplex des gènes *wzm* et *mip* chez les isolats LAXA, LAXB et LS ainsi que chez certains isolats cliniques de légionelles qui représentent des témoins positifs. Les isolats ont par la suite été classés en fonction des résultats de PCR et du criblage immunologique (tableau 14).

IV.2.4 Bilan des typages moléculaire et immunologique.

Les résultats des criblages moléculaires et immunologiques sont identiques pour 94,44 % des isolats (34/36, dont deux isolats, LAXA53 et LAXA54 n'appartiennent pas au genre *Legionella*), contradictoires pour 5,55 % (2/36) des isolats. Les deux isolats pour lesquels les résultats des deux approches sont contradictoires sont LAXB11 et LS8. En effet l'approche moléculaire tend à les classer dans le genre *Legionella*, puisque les amplifications des gènes *ARNr16S* et *mip* sont positives, mais les tests immunologiques sont en désaccord. Pour LAXB11, l'amplification du gène *lpg1905* suggère même une appartenance à l'espèce *pneumophila*. Par contre, les deux tests immunologiques ne reconnaissent pas LAXB11 et LS8 comme des légionelles. Il ne peut être exclu que ces deux isolats qui appartiennent à d'autres espèces de légionelles non incluses dans le kit d'immunotypage, en particulier un nouveau sérotype.

Le résultat de l'approche moléculaire pour les souches LAX53 et LAXA54 ne permet pas de les classer avec certitude. L'amplification du gène *ARNr16S* avec des amorces spécifiques au genre *Legionella* est négative alors que celle du gène *mip*, spécifique au genre *Legionella*, est positive. De plus, ces deux souches sont considérées comme des non *Legionella* par immunotypage.

Tableau 14 : Résultats des caractérisations moléculaire et immunologique des isolats environnementaux de la source Soufre

	Souches	ARNr 16S	mip	Lpg1905	Lpg0774	wzm	Classification par typage moléculaire	Classification par typage immunologique
Souches LAXB biofilms nov 2010	1	+	+	+	-	-	Lp	Lp10
	2	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	3	+	+	+	-	-	Lp	Lp10
	4	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	5	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	6	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	7	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	8	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	9	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	10	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	11	+	+	+	-	-	nd	nd
	12	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	13	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	14	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	15	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	16	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	17	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	18	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	19	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	20	+	+	+	-	-	Lp	Lp10
	21	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	22	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	23	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	24	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	25	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
Souches LAXA aout 2010	21	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	22	+	+	+	-	-	Lp	Lp10
	23	+	+	+	-	-	Lp	Lp10
	53	-	+	-	-	-	nd	Non <i>Legionella</i>
	54	-	+	-	-	-	nd	Non <i>Legionella</i>
Legiosecuré (Ls) juin-sept 2010	6	+	+	+	-	-	Lp	Lp10
	8	+	+	-	-	-	L	??
	25	+	+	+	-	-	Lp	Lp12
	26	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	27	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	28	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
Isolats cliniques	Lp1 <i>Lens</i>	+	+	+	-	+	Lp1	Lp1
	<i>Lens dotA</i>	+	+	+	+	+	Lp1	
	Lp1 <i>Paris</i>	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1	Lp1
	<i>L. anisa</i>	+	+	-	-	-	<i>L. anisa</i>	<i>L. anis</i>
	<i>L.</i>	+	+	-	-	-	<i>L.</i>	<i>L. longbeachae</i>

Nd : pas de réaction Latex

Lp : *L. pneumophila*

Suite au résultat inattendu de l'amplification du gène *mip* chez les souches LAXA53 et 54, le gène de l'ARNr 16s a été amplifié de nouveau avec d'autres amorces moins spécifique du genre *Legionella* ainsi que les gènes *wzm* et *mip*. Les résultats sont présentés dans la figure 51.

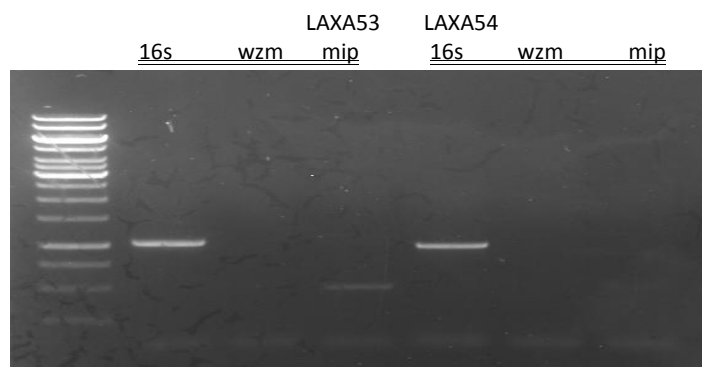


Figure 51 : Résultats de l'amplification des gènes 16s, *mip* et *wzm* chez les souches LAXA53 et 54

Ce résultat confirme l'amplification du gène *mip*, mais faiblement et uniquement chez la souche LAXA53. Aucune bande correspondante au gène *mip* n'est détectée pour la souche LAXA54. Ceci ne remet pas en cause les résultats précédents qui ont été obtenus à plusieurs reprises, à savoir l'amplification du gène *mip* chez ces deux souches. Ce nouveau résultat a été obtenu dans de nouvelles conditions de PCR, et d'ailleurs même la bande correspondante au gène *mip* de la souche LAXA53 est faible et suppose donc que la PCR de ce gène n'est pas optimale dans ces conditions. Par ailleurs le gène *ARNr 16s* a été bien amplifié en utilisant les nouvelles amorces et le gène *wzm* n'a pas été amplifié. Les produit PCR du gène *ARNr 16s* ont été purifiés puis séquencés. La séquence du gène *ARNr 16s* de ces deux souches présente une homologie de séquence de 100% avec la séquence du gène *ARNr 16s* du genre *Mycobacterium*. Ainsi ce résultat confirme que ces deux souches n'appartiennent pas au genre *Legionella* mais au genre *Mycobacterium*.

En conclusion, sur les 36 isolats, 32 isolats qui ont pu être typés avec certitude comme des légionelles par plusieurs approches complémentaires (physiologique, biochimique, immunologique et moléculaire), sont gardés pour la suite de l'étude.

IV.2.5 Etude de la diversité moléculaire des légionelles isolées de la source « Soufre » d'Aix Les Bains

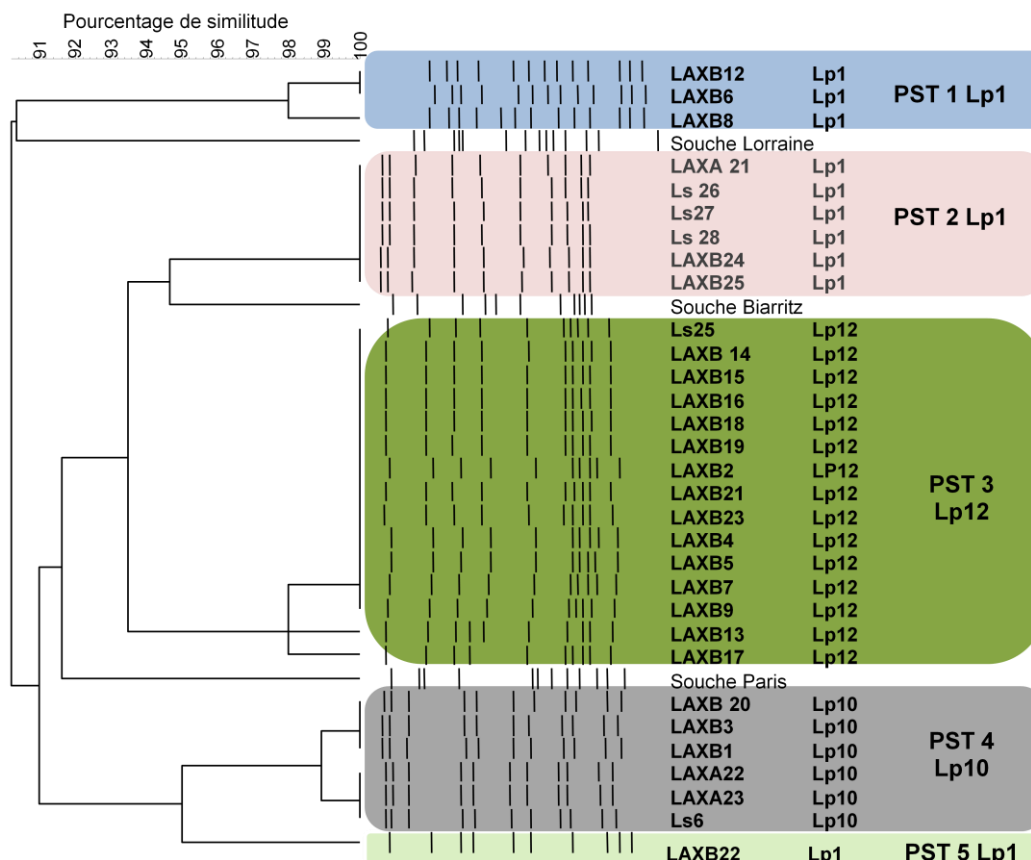
IV.2.5.1 PFGE : Comparaison des pulsotypes des isolats environnementaux

L'analyse de l'ADN total de 31 isolats environnementaux sur 32 appartenant au genre *Legionella* a été effectuée par PFGE ; LAXB10 ne faisant pas partie de cette étude, car la culture de cet isolat n'a pu se développer dans le temps imparti. Les résultats sont présentés dans la figure 52.

Cinq profils PFGE ou pulsotypes (PST) ont été identifiés et aucun de ces pulsotypes ne correspond à un des pulsotypes d'isolats cliniques ou environnementaux répertoriés par le CNRL (Centre National de Référence des Légionelles), comme le montrent les pulsotypes des *Lp1* Lorraine, Biarritz et Paris, mais aussi d'autres *Lp1* (Lens, Philadelphia, non montré sur la figure 52). Les 5 pulsotypes ont les caractéristiques suivantes :

- PST1 et PST2 : comprennent respectivement 3 et 6 *Lp1* ;
- PST3 comprend les 15 *Lp12* ;
- PST4 comprend les 6 *Lp10* ;
- PST5 comprend 1 seule *Lp1*.

COMPARAISON DE SOUCHES PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE



Logiciel GELCOMPAR II, méthode UPGMA, erreur tolérée 1,5 %
 PST: Pulsotype

Figure 52 : Dendrogramme représentant les relations entre 31 isolats environnementaux de la source soufre et des isolats cliniques *L. pneumophila* sg1. Les profils de l'ADN bactérien total sont obtenus après PFGE et sont normalisés à l'aide du logiciel GelComparII.

Ainsi, les isolats du sérotype 1 sont répartis en 3 pulsotypes distincts : PST1 (3 isolats), PST2 (6 isolats) et PST5 (un seul isolat). Ceci traduit, la diversité génétique des isolats du sérotype 1. Au contraire, on ne retrouve pas cette diversité pour les isolats des sérotypes 10 et 12 isolés ici qui sont regroupés dans un seul pulsotype, PST4 et PST3, respectivement.

IV.2.5.2 Les séquences mip

Pour une étude approfondie de la diversité des souches de *Legionella* isolées de la source « Soufre » les gènes *mip* des 32 isolats environnementaux ont été amplifiés par PCR avec une polymérase haute fidélité puis séquencés. La comparaison des 32 séquences a permis d'identifier trois types de séquences qui ont été nommées *mip1*, *mip2* et *mip3*. L'alignement de ces séquences a été effectué à l'aide du logiciel en ligne « clustalw2 » (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2>).

La comparaison de ces 3 séquences (*mip1*, *mip2* et *mip3*) montre un pourcentage d'identité supérieur à 99% et a permis d'identifier plusieurs substitutions de bases (figure 53). En effet, on constate 5 substitutions entre les séquences *mip1* et *mip2*, 4 substitutions entre *mip1* et *mip3* et une seule substitution entre les séquences *mip2* et *mip3*.

mip2	GGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAGCTACAGACAA	60
mip3	GGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAGCTACAGACAA	60
mip1	GGGGCTTGCAATGTCAACAGCAATGGCTGCAACCGATGCCACATCATTAGCTACAGACAA	60

mip2	GGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTAAAAATCAAGGCAT	120
mip3	GGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTAAAAATCAAGGCAT	120
mip1	GGATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTAAAAATCAAGGCAT	120

mip2	AGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCTATGAGTGCGCTCAATT	180
mip3	AGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCTATGAGTGCGCTCAATT	180
mip1	AGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGCTATGAGTGCGCTCAATT	180

mip2	GGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAGTTTCAGAAAGATTTGATGGC	240
mip3	GGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAGTTTCAGAAAGATTTGATGGC	240
mip1	GGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTCTTAACAAGTTTCAGAAAGATTTGATGGC	240

mip2	AAAGCGTACTGCTGAATCAATAAGAAAGCGGATGAAAAATAAGTAAAAGGGGAAGCCTT	300
mip3	AAAGCGTACTGCTGAATCAATAAGAAAGCGGATGAAAAATAAGTAAAAGGGGAAGCCTT	300
mip1	AAAGCGTACTGCTGAATCAATAAGAAAGCGGATGAAAAATAAGTAAAAGGGGAAGCCTT	300

mip2	TTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGTTGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAA	360
mip3	TTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGTTGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAA	360
mip1	TTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGTTGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAA	360

mip2	AGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTTAAACCTGGTAAATCGGATACAGTCACTGTGCGAATA	420
mip3	AGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTTAAACCTGGTAAATCGGATACAGTCACTGTGCGAATA	420
mip1	AGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTTAAACCTGGTAAATCGGATACAGTCACTGTGCGAATA	420

mip2	CACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGC	480
mip3	CACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGC	480
mip1	TACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGC	480

mip2	AACTTTTCAGGTTTCACAAGTTATCCCAGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGC	540
mip3	AACTTTTCAGGTTTCACAAGTTATCCCAGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGC	540
mip1	AACTTTTCAGGTTTCACAAGTTATCCCAGGATGGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCAGC	540

mip2	TGGATCAACTTGGGAAATTTATGTTCC----- 568	
mip3	TGGATCAACTTGGGAAATTTATGTTCCCTCAGGTCTTGCAATATGGCCC 588	
mip1	TGGATCAACTTGGGAAATTTATGTTCCCTCAGGTCTTGCAATATGGCCC 588	

Figure 53 : Alignement des séquences *mip1*, *mip2* et *mip3*

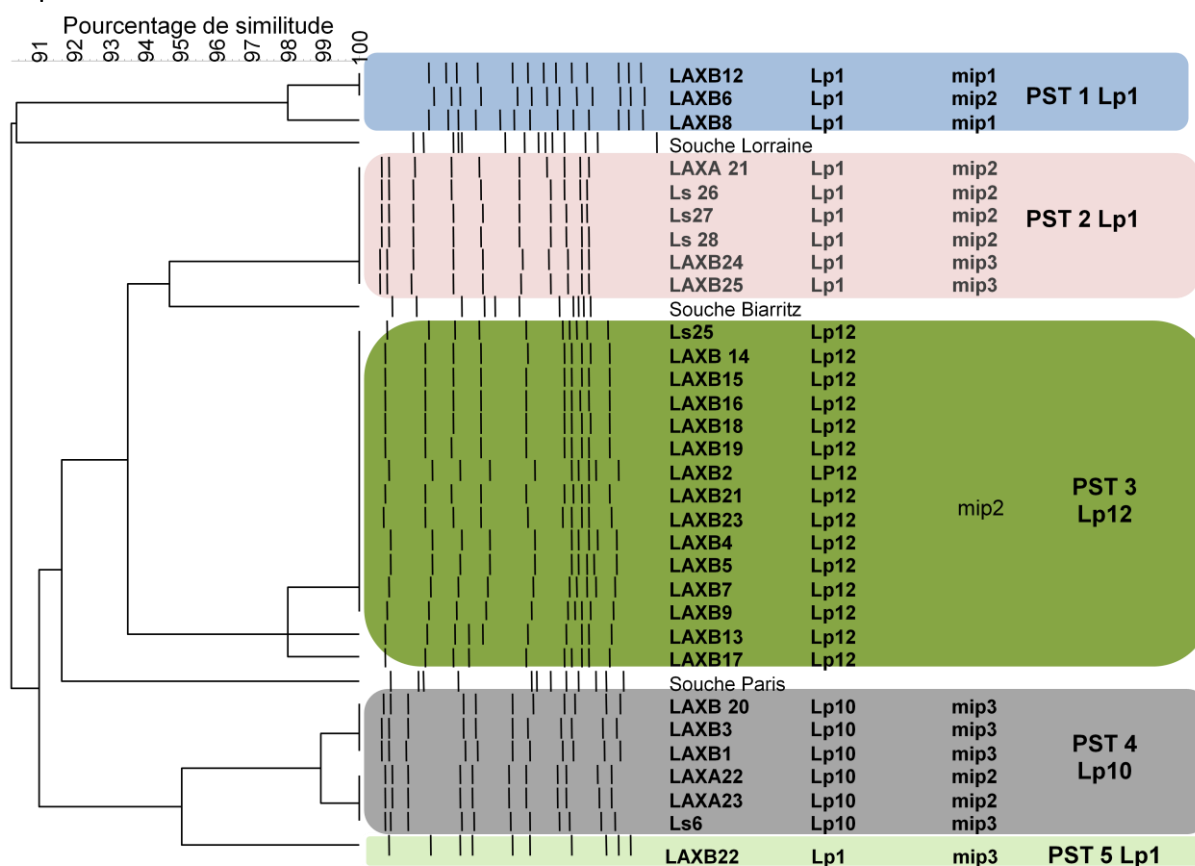
Les 3 séquences *mip* identifiées montrent également une forte homologie de séquence avec les séquences *mip* des souches cliniques répertoriées (identité supérieure à 99,6%). La séquence *mip3* est complètement identique à la séquence *mip* de la souche clinique *Lp1* Corby. Cette classification, basée sur la séquence *mip*, confirme les résultats obtenus avec les autres approches de typage (sérotypage et typage moléculaire). Elle permet également de positionner les différents isolats environnementaux dans le cluster de l'espèce *pneumophila*.

IV.2.5.3 Relations entre pulsotypes, sérotypes et séquences *mip*

La répartition des 32 isolats en fonction des séquences du gène *mip* démontre que seuls 2 isolats possèdent la séquence *mip1*, 23 isolats possèdent la séquence *mip2* et 7 isolats la séquence *mip3* (figure 54).

Il n'y a pas une corrélation stricte entre les séquences de type *mip2* et *mip3* et un pulsotype ou un sérotype (figure 54). Par contre, la séquence *mip1* est ici strictement spécifique des isolats du sérotype 1 qui sont associés au pulsotype 1 (PST1). Cette approche montre aussi l'absence de

diversité au sein des isolats du séro groupe 12 qui sont caractérisés par le même pulsotype (PST3) et la même séquence *mip2*, ce qui suggère que tous les isolats du pulsotype 3 pourraient correspondre à la même souche.



Logiciel GELCOMPARE II, méthode UPGMA, erreur tolérée 1,5 %
PST: Pulsotype

Figure 54 : Relations entre pulsotypes, sérogroupes et séquences *mip*

Cette approche révèle une diversité génétiques des souches *Lp10* qui appartiennent à un unique pulsotype (PST4) mais qui sont différenciées par deux séquences *mip* : *mip 2* et *mip 3* (une seule substitution entre elles). Les souches environnementales appartenant au sg 1 sont caractérisées par une forte diversité génétique puisque ils appartiennent à 3 pulsotypes distincts PST1, PST2 et PST5 et se caractérisent par 3 séquences *mip* (*mip1*, *mip2* et *mip3*).

Cette analyse permet également de caractériser les 5 souches LS qui ont été isolées lors des traitements Perox à partir des biofilms traités. Les biofilms utilisés dans cette étude et dans les études de traitements biocides ont en effet la même origine (source S) et la même modalité de préparation. Cette caractérisation a également permis d'assigner ces souches traitées à des souches parentales non traitées. La souche LS6 (*Lp10*, *mip3* et PST4) présente les caractéristiques des souches LAXB1, 3 et 20. Les souches LS26, 27 et 28 (*Lp1*, *mip2* et PST2) ont les mêmes caractéristiques que LAXA21. La souche LS25 (*Lp12*, *mip2* et PST3) a les caractéristiques des souches LAXB de séro-groupe 12. Les souches LAXB1, 3 et 20, LAXA21 et LAXB sg12 pourrait donc être les souches parentales de la souche LS6, des souches LS26, 27 et 28 et de la souche LS25, respectivement.

Les séquences *mip* des souches LS traitées à l' H_2O_2 /UV (LS6) et aux UV (LS27 et LS28) ne présentent aucune mutation par rapport aux souches supposées parentales à ces souches traitées. Ce résultat n'est pas anodin puisque l'architecture de notre dispositif expérimental des expériences Perox ne permet pas une exposition directe des biofilms aux UV (cf. chapitre suivant). Ainsi les

souches sessiles de légionelles et (autres bactéries) ne sont pas directement exposées aux UV et le risque de mutation est moindre.

IV.2.6 Comparaison des séquences du gène *mip* des isolats environnementaux de la source Soufre et celles des isolats cliniques référencés

Les pourcentages d'identité entre les séquences *mip1*, *mip2* et *mip3* des isolats environnementaux avec les séquences *mip* de certains isolats cliniques sont très élevés (>99%) (tableau 15).

Tableau 15 : Pourcentage d'identité des séquences *mip* des isolats environnementaux et des isolats cliniques (selon le logiciel MEGA, <http://www.megasoftware.net/>)

	<i>Legionella</i>			<i>L. pneumophila sg1</i>				Isolats source « Soufre »		
	* <i>micdadeii</i>	** <i>Longbeachae</i>	*** <i>anisa</i>	Lens	Corby	Paris	Philadelphia	<i>mip1</i>	<i>mip2</i>	<i>mip3</i>
<i>L. micdadeii</i>										
<i>L. longbeach</i>	99.594									
<i>L. anisa</i>	99.567	99.831								
Lens	99.613	99.709	99.694							
Corby	99.612	99.714	99.694	99.993						
Paris	99.601	99.719	99.690	99.980	99.987					
Philadelphia	99.601	99.719	99.690	99.980	99.987	100				
<i>mip1</i>	99.609	99.713	99.688	99.986	99.993	99.991	99.991			
<i>mip2</i>	99.612	99.714	99.694	99.991	99.998	99.986	99.986	99.991		
<i>mip3</i>	99.612	99.714	99.694	99.993	100	99.987	99.987	99.993	99.998	

L. micdadeii* (AF023175) *L. longbeachae* (NSW150) ****L. anisa* (AF022312)

Le pourcentage d'identité des séquences *mip* des isolats environnementaux et de trois espèces de *Legionella* (*micdadeii*, *longbeachae* et *anisa*) est compris entre 99.6 et 99.7%. Il est supérieur à 99.8 % pour les souches cliniques de *L. pneumophila* (Lens, Paris, Corby et Philadelphia). Il est intéressant de souligner que le pourcentage d'identité est de 100% entre la séquence *mip3* et la séquence *mip* de la souche Corby. Ces homologues ont permis d'élaborer un arbre phylogénétique des séquences *mip* des différentes souches (figure 55).

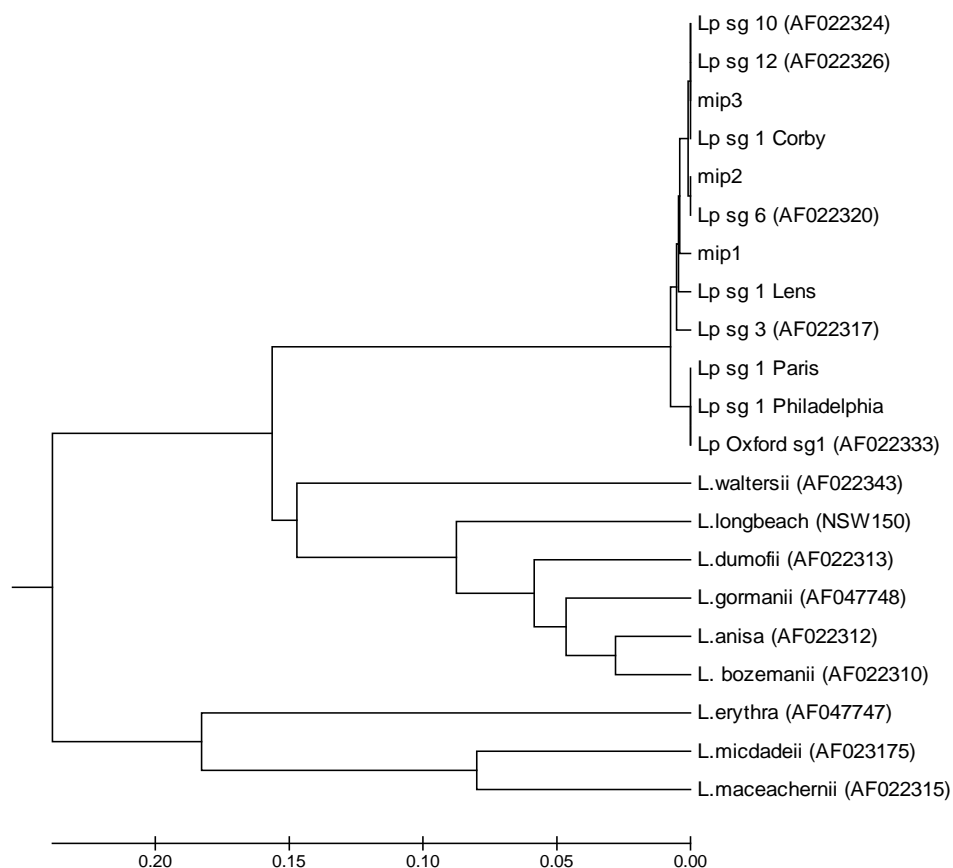


Figure 55 : Arbre phylogénétique des séquences *mip1*, *mip2*, *mip3* et des séquences *mip* d'isolats cliniques de légionelles (réalisé à l'aide du logiciel MEGA 5).

La figure 55 montre que les 3 types de séquence *mip* (*mip1*, *mip2* et *mip3*) rentrent bien dans le cluster des séquences *mip* des isolats cliniques de *L. pneumophila*. Ainsi, on peut dire que l'analyse des séquences *mip1*, *mip2* et *mip3* et leur phylogénie confirment bien la classification des isolats environnementaux de la source soufre dans l'espèce *pneumophila* de *Legionella* ainsi que la forte diversité moléculaire des isolats *L. pneumophila* du sérotype 1 contrairement à ceux des sérotypes 10 et surtout 12.

IV.2.7 Bilan des différents criblages des isolats de légionelles de la source soufre

Les 32 isolats provenant de la source soufre sont des *L. pneumophila* peuvent être répartis en 8 classes différentes sur la base de leur sérotype (sg), de leur pulsotype (PST) et du type de leur séquence *mip* (tableau 16). Cette classification rend bien compte de la très forte diversité des souches *L. pneumophila* du sérotype 1.

Tableau 16 : Classification des 32 isolats environnementaux issus de la source Soufre

Classes	Sg	PST	mip	souches	Nombre de souches	
1	sg1	PST1	mip1	LAXB8, LAXB12	2	
2	sg1	PST1	mip2	LAXB6	1	
3	sg1	PST2	mip2	LAXA21, LS26, LS27, LS28	4	10
4	sg1	PST2	mip3	LAXB24, LAXB25	2	
5	sg1	PST5	mip3	LAXB22	1	
6	sg10	PST4	mip2	LAXA22, LAXA23	2	6
7	sg10	PST4	mip3	LAXB1, LAXB3, LAXB20, LS6	4	
8	sg12	PST3	mip2	LAXB2, LAXB4, LAXB5, LAXB7, LAXB9, LAXB13, LAXB14, LAXB15, LAXB16, LAXB17, LAXB18, LAXB19, LAXB21, LAXB23, LS25, LAXB10*	16	16
<i>Total souches</i>					32	32

*LAXB10 est positionné dans la classe 8 car malgré l'absence d'identification du PST, il est de sg12 avec une séquence mip2.

IV.2.8 Virulence

IV.2.8.1 "Plate test"

L'objectif du « plate test » est d'identifier les souches de légionelles virulentes vis-à-vis de l'amibe environnementale *Acanthamoeba castellanii* parmi les isolats environnementaux isolés de la source Soufre. Cette amibe est souvent utilisée comme hôte pour ce type de test de virulence qui permet de cribler rapidement un grand nombre de légionelles (Moffat et Tompkins, 1992). Ce test consiste à déposer 3 µl des suspensions bactériennes (et leurs dilutions) sous forme de spot sur le tapis amibien déjà préparé sur le milieu BCYE. Après l'incubation, la virulence est mise en évidence par le développement de colonies au sein des spots de 3 µl déposés sur les boîtes de Pétri. En effet, la capacité d'infection de la souche *Lp* déposée lui permettra (ou non) d'infecter l'amibe, de la lyser et ensuite de se développer sur le milieu de croissance BCYE.

Les souches environnementales isolées lors des deux campagnes de prélèvement (LAXA et LAXB) et lors des expériences Légiosécure (LS) ont été testées en parallèle avec des souches cliniques de sg1 qui servent de références. Un mutant avirulent *dotA*, dérivé de la souche Lens a été utilisé comme un témoin négatif lors de ces expériences. Un exemple des résultats de ces expériences est présenté dans la figure 56.

Plate test sur *A. castellanii*

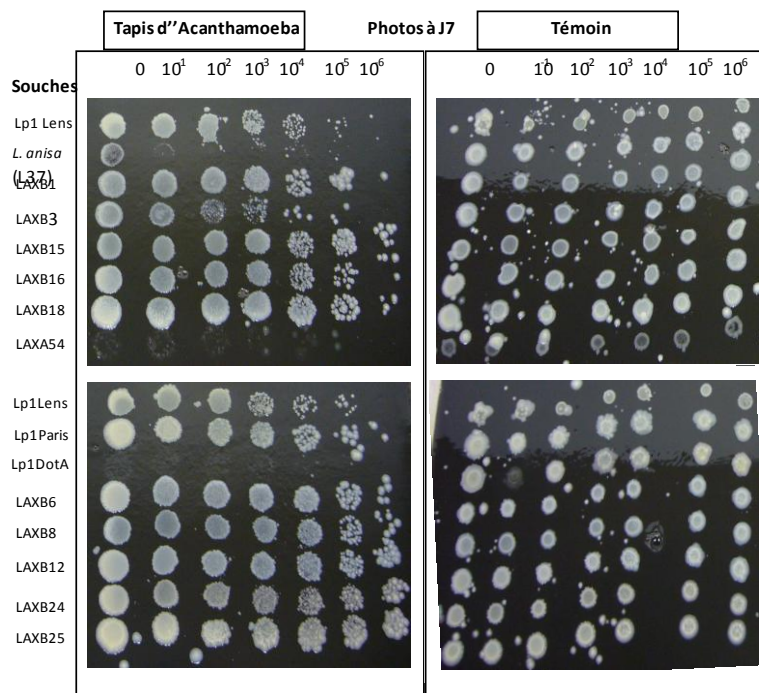


Figure 56 : Exemple de résultats d'un Plate test, les photos des boîtes de Pétri ont été prise après 7 jours d'incubation.

La virulence des souches testées est estimée par le nombre de colonies qui se développent sur la boîte de Pétri couverte d'un tapis amibien. Le témoin sert d'indicateur de croissance bactérienne en absence de tapis amibien. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 57.

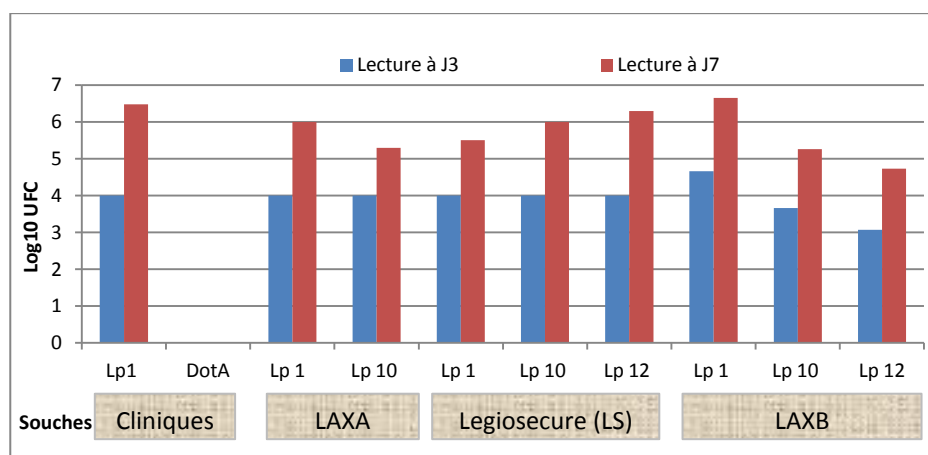


Figure 57 : Résultats du « Plate test » des souches environnementales isolées de la source « Soufre » et des souches cliniques du sg 1

Ce test semi quantitative, donne uniquement une indication sur la virulence de ces souches et permet de faire un premier criblage des isolats en fonction de la virulence. Les résultats montrent donc que tous les isolats appartenant à l'espèce *pneumophila* sont virulents vis-à-vis d'*A. castellanii*, ce, quel que soit leur sérotype. Les souches LAXA53 et LAXA54, qui n'appartiennent pas à cette espèce selon les différents typages réalisés ne sont pas virulentes vis-à-vis d'*A. castellanii* (résultat non montré).

Afin d'affiner ces résultats, nous nous sommes focalisés sur des tests de virulences quantitatifs qui permettent de discriminer les isolats en fonction de leur virulence, toujours vis-à-vis d'*A. castellanii*.

IV.2.8.2 Test d'infection liquide

Ce test est effectué dans un milieu liquide, donc dans des conditions plus proches des conditions « naturelles ». La quantification de la virulence des isolats est effectuée de deux façons différentes :

- par la quantification des légionelles cultivables libérées après la lyse amibienne ;
- par la quantification de la cytotoxicité de *Legionella* en estimant le pourcentage d'amibes mortes : méthode colorimétrique au bleu d'Alamar.

IV.2.8.2.1 Estimation des légionelles extra cellulaires : virulence vis-à-vis d'*A. castellanii*

Ce test consiste à quantifier les légionelles extracellulaires libérées après la lyse amibienne. Cette quantification est réalisée par culture sur milieu BCYE. Les suspensions bactériennes sont prélevées à partir des puits contenant les amibes infectées après 24 h et 48 h d'infection. 3 µl de chaque suspension et de ces dilutions sont déposés sous forme de spot à la surface du milieu BCYE. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 30°C pendant 3 à 4 jours. La quantification de la virulence est effectuée par le dénombrement des colonies de légionelles qui se sont développées au sein des spots de dépôt de 3 µl.

La figure 58 montre un exemple de boîtes de Pétri ensemencées par les suspensions de légionelles extracellulaires prélevées des puits contenant les amibes infectées.

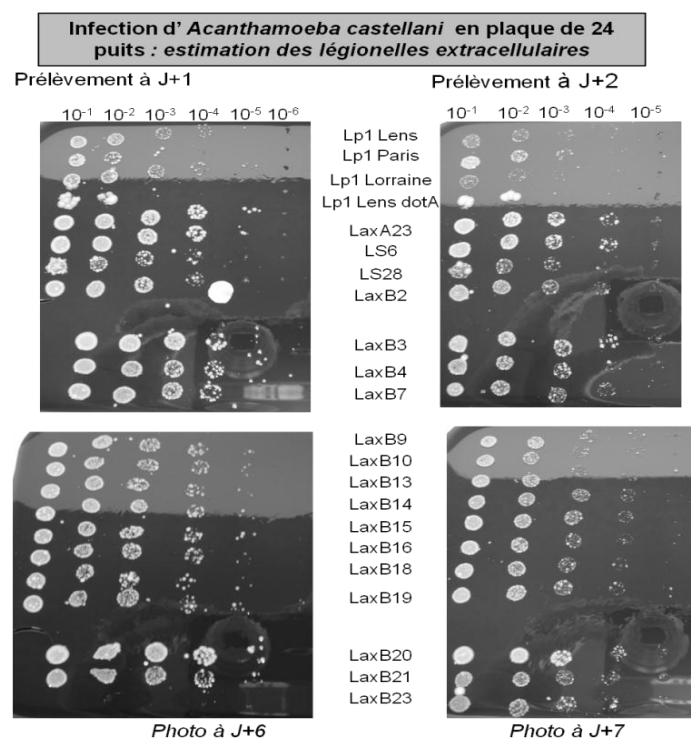


Figure 58: Photos de boîte de Pétri montrant les colonies des légionelles ensemencées à partir des puits contenant les amibes d'*A. castellanii* infectées

Lors de la croissance des légionelles avec les amibes, les amibes non infectées ou infectées par le mutant *dotA* forment des tapis confluents (figure 59 A et B). Ces amibes sont allongées avec

des vacuoles visibles sous le microscope optique. Par contre, les amibes infectées par des souches de *Legionella* virulentes sont de forme sphérique, parfois avec des membranes rompues, sont remplies de bactéries et ne forment pas de tapis amibien (figure 59 C et D).

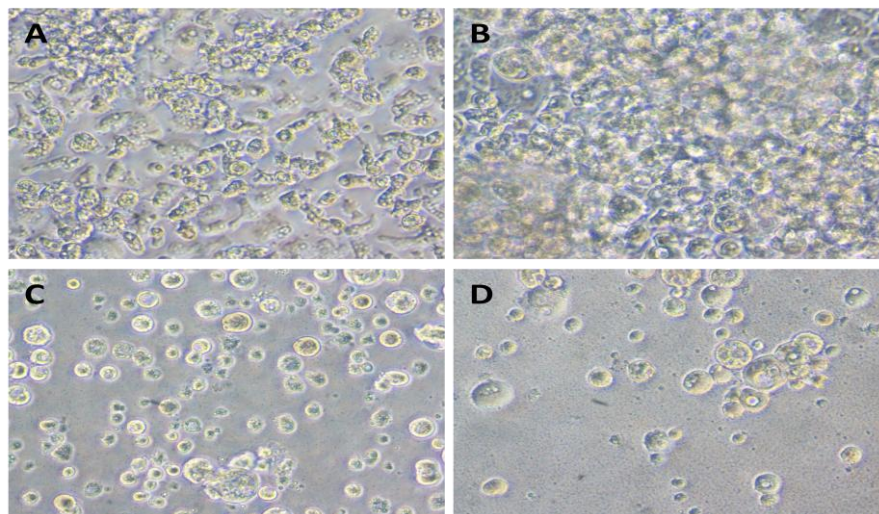


Figure 59 : Photo des puits contenant un tapis d'*A. castellanii* : (A) non infectée, (B) infectée par le mutant *dotA*, (C) infectée par la souche *Lp1* Lens et (D) infectée par la souche environnementale LAXB8 (*Lp1*)

La figure 60 montre les résultats de l'estimation des légionelles extracellulaires après 24 h et 48 h d'infection d'*A. castellanii* par des souches cliniques de *L. pneumophila* sg 1.

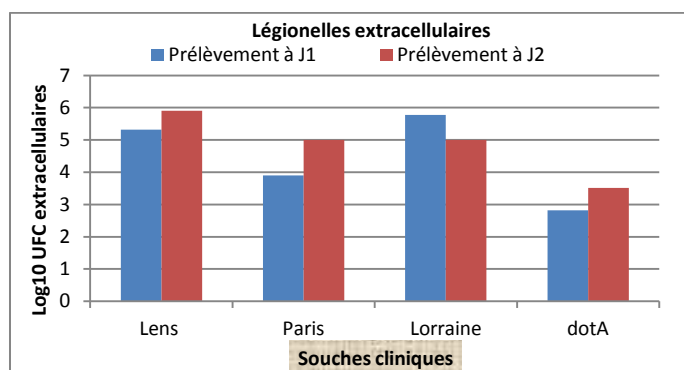


Figure 60 : Estimation des légionelles extracellulaires après 24 h et 48 h d'infection d'*A. castellanii*

La figure 61 montre les résultats de l'estimation des légionelles extracellulaire après 24 h et 48 h d'infection d'*A. castellanii* par les souches environnementales de *L. pneumophila* classées en fonction de la campagne de prélèvement et le sg (figure 61-A) et en fonction des classes établies selon la caractérisation effectuée (figure 61-B).

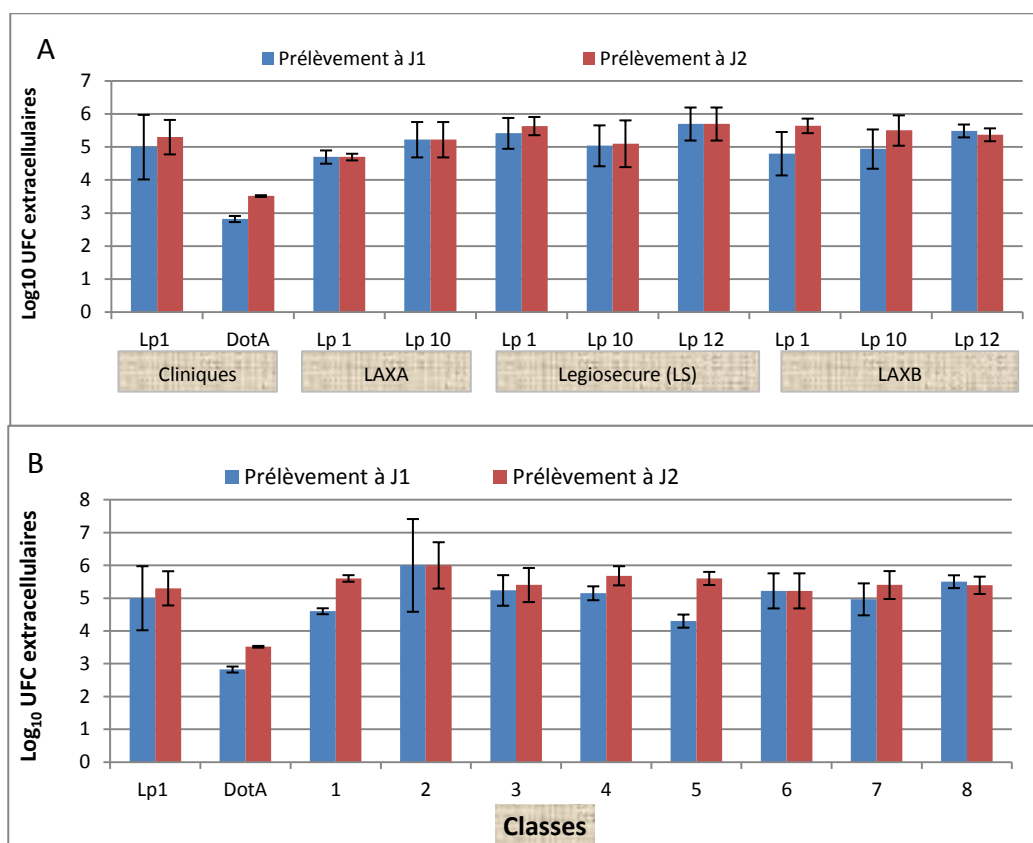


Figure 61 : Estimation des légionelles extracellulaires après 24 h (colonnes bleues) et 48 h (colonnes rouges) d'infection d'*A. castellanii*. (A) selon le sg des isolats et la campagne de prélèvement (B) selon les classes d'isolats (sg, séquences *mip*, et *PST*)

Lors de ce test, les souches cliniques de *Lp 1* impliquées dans des cas de légionelloses (Lens et Loraine) et la souche endémique Paris ont été utilisées comme référence. Après 24 et 48 h d'infection d'*A. castellanii*, 1×10^5 et $4,5 \times 10^5$ de *Lp1* cliniques extracellulaires ont été dénombrés dans 3 μ l d'échantillon, respectivement. A la même période, les légionelles extracellulaires libérées des amibes infectées par le mutant *dotA* étaient 100 fois moindre que les souches cliniques. Le nombre de légionelles extracellulaires libérées des amibes infectées à l'aide des souches environnementales était similaire à celui des *Lp1* cliniques. À 48 h post-infection, aucune différence significative de la virulence n'a été observée entre les souches environnementales quelque soit le sg ou la campagne de prélèvement (figure 61-A) et la classe des isolats (figure 61-B). Certaines souches présentent néanmoins un retard de virulence à 24 h post infection mais retrouvent un niveau similaire à celui des autres souches à 48 h post infection.

IV.2.8.2.2 Cytotoxicité

Le bleu Alamar a été utilisé pour la quantification de la cytotoxicité des légionelles vis-à-vis de l'amibe *A. castellanii*. La cytotoxicité a été estimée par le pourcentage d'amibes mortes après 24 h et 48 h d'infection. Les résultats sont présentés dans la figure 62.

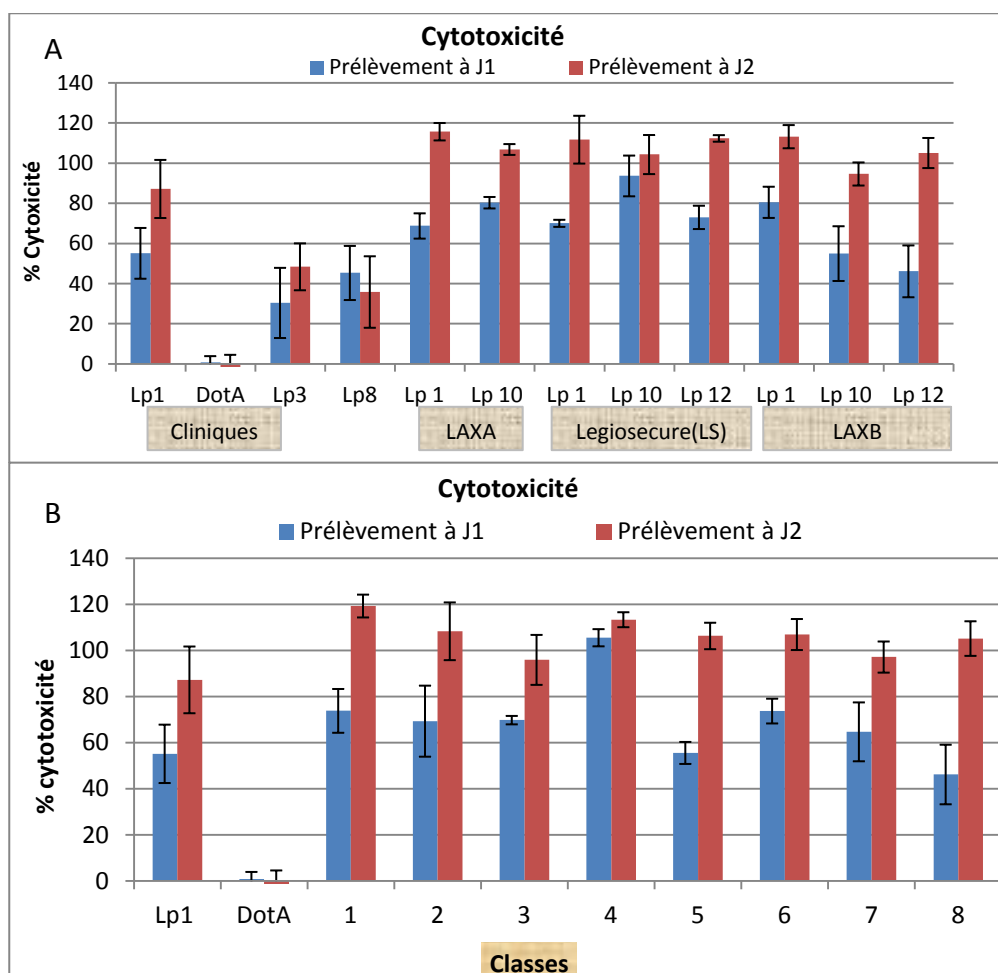


Figure 62 : Cytotoxicité des légionelles vis-à-vis de l'amibe *A. castellanii* après 24 h (colonnes bleues) et 48 h (colonnes rouges) d'infection. (A) selon le sg des isolats et la campagne de prélèvement (B) selon les classes d'isolats (sg, séquences *mip*, et PST)

Le niveau de cytotoxicité des *Lp1* cliniques (Lens, Paris et Lorraine) est estimé à environ 50 % et environ 80 % après 24 h et 48 h d'infection, respectivement. Le mutant avirulent *dotA*, dérivé de la souche Lens, ne montre aucune cytotoxicité (0%). Les souches environnementales isolées de la source S, présentent une toxicité sensiblement supérieure à celle des souches *Lp1* cliniques notamment à 48 h d'infection. Les souches environnementales sont caractérisées par 100% de toxicité et aucune différence significative de cytotoxicité n'a été observée entre ces isolats quelque soit les sg, la campagne de prélèvement (figure 62- A) et la classe de l'isolat (figure 62-B).

IV.2.9 Coïnfection d'*A.castellanii* par deux souches : *Lp1* et *Lp12*

Afin d'expliquer la dominance du sérotype 12 dans les biofilms de la source « S », une coïnfection a été réalisée vis-à-vis d'*A. castellanii* avec deux isolats environnementaux représentatifs de *Lp1* (LAXB24) et *Lp12* (LAXB2). Une PCR multiplex a été réalisée sur les extraits cellulaires des bactéries extracellulaire libérées après 48 h d'infection à l'aide des amorces des gènes *lpg1905* et *wzm*, marqueur de l'espèce *pneumophila* et du sg1 de *L. pneumophila*, respectivement. Les résultats de la multiplex PCR révèlent que 95% des 40 clones analysés appartenaient à la souche *Lp12* (LAXB2). Ce résultat suggère un développement plus rapide et avantageux de cette souche par rapport à la souche *Lp1*.

IV.2.10 Effet des traitements biocides sur les concentrations des isolats environnementaux de *L. pneumophila* (étude *in vitro*)

Les essais de traitements ont été réalisés uniquement sur 4 souches de *L. pneumophila* du séro groupe 1. Ces souches sont LAXB6, 8, 22 et 24, elles appartiennent à 4 classes de *Lp* distinctes selon la classification basée sur le sg, le PST et la séquence du gène *mip*. Il a été impossible de réaliser ces expériences sur l'ensemble des classes et sur des souches cliniques dans le temps imparti, aussi le sg 1 a été choisi du fait de sa forte implication dans les cas de légionelloses.

Au préalable des expériences de traitements, une mise au point du protocole expérimental a été nécessaire, notamment pour la détermination du milieu de culture dans lequel les expériences sont réalisées et les cinétiques de dégradation de l' H_2O_2 dans les conditions de ces expériences.

IV.2.10.1 Choix du milieu de culture

Le milieu BCYE de base pourrait générer des interférences avec les deux composantes, H_2O_2 et UV, du procédé PEROX. La forte dose de matière organique dans le milieu BCYE standard pourrait influencer le procédé de traitement et ne reflète pas les concentrations rencontrées dans l'environnement. En effet, les photons UV pourraient être masqués par cette matière organique et les radicaux hydroxyles OH^\bullet réagissant avec les composés organiques seraient donc moins disponibles pour agir sur les cellules bactériennes.

De plus, la dégradation de l' H_2O_2 pourrait y être rapide du fait de la présence de fer III (pyrophosphate de fer III) qui est un catalyseur de la décomposition du peroxyde d'hydrogène selon les réactions suivantes :

- Etape 1 : $2 Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow 2 H^+ + O_2 + 2 Fe^{2+}$ (transformation rapide)
- Etape 2 : $2 Fe^{2+} + 2 H^+ + H_2O_2 \rightarrow 2 Fe^{3+} + 2 H_2O$ (transformation rapide)
- Bilan : $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ (réaction rapide)

Par ailleurs, le dosage de l' H_2O_2 s'est avéré impossible dans ce milieu du fait de la formation de précipités.

Par conséquent, le milieu devait donc être modifié afin de minimiser ces interférences mais il fallait alors s'assurer que ces modifications n'avaient pas d'incidence sur la cultivabilité des légionelles.

3 variantes du milieu BCYE ont été testées :

- BCYE standard dilué au 1/10 ;
- BCYE sans fer III dilué au 1/10 ;
- BCYE sans fer III dilué au 1/100.

Dans un premier temps, des cinétiques de dégradation de l' H_2O_2 dans ces variantes ont été réalisées. Dans un deuxième temps, ces milieux ont étéensemencés par des souches de *Lp* (sg1) pour vérifier que leur composition n'affecte pas la viabilité des *Lp*.

IV.2.10.2 Cinétique de dégradation de l' H_2O_2

Des cinétiques de dégradation de l' H_2O_2 ont été réalisées dans les différentes variantes du BYE à des concentrations de 10, 30 et 50 ppm d' H_2O_2 initiale. La figure 63 présente ces cinétiques de dégradation. Ces résultats démontrent que la vitesse de dégradation de l' H_2O_2 est plus rapide dans le milieu BYE standard (en présence de fer III). La dégradation de l' H_2O_2 dans la variante de BYE sans fer III est relativement faible et similaire à celle observée dans l'eau Brita.

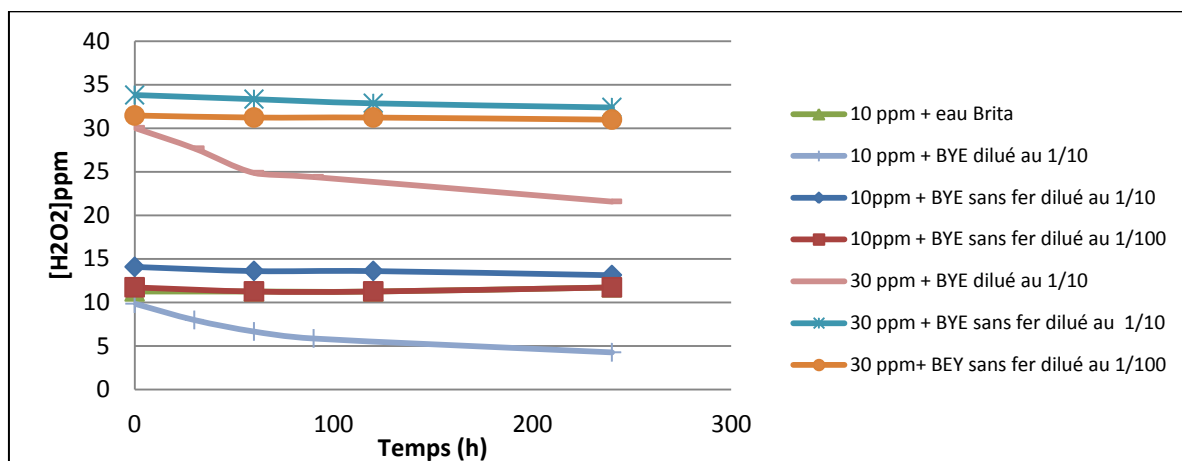


Figure 63 : Cinétique de dégradation de l'H₂O₂ dans les différentes variantes du milieu BYE

IV.2.10.3 Viabilité des *L. pneumophila* dans les variantes du milieu BYE

La viabilité des souches de *Lp* dans les différents milieux a été mesurée pendant 24 h. Il est en effet important que le milieu de culture utilisé n'affecte pas (positivement ou négativement) la viabilité des *Lp* pour pouvoir mettre en évidence d'éventuels effets des traitements appliqués. Ces milieux ont étéensemencés par une souche de *Lp*1 environnementale à une concentration d'environ 8 Log. La figure 64 présente les abattements des concentrations des *Lp* cultivables dans les milieux de culture testés et observés pendant 24 h d'incubation. L'incubation a été réalisée à une température de 28°C.

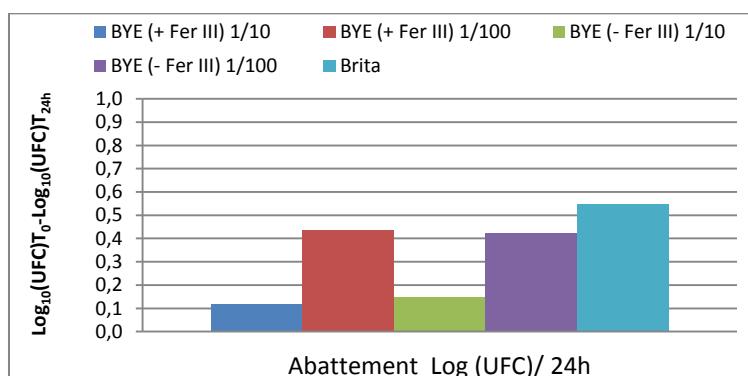


Figure 64 : Abattements des concentrations des *Lp* observés après 24 h d'incubation dans les variantes du milieu BYE

Quel que soit le milieu de culture utilisé, l'abattement des *Lp* cultivables est égal ou inférieur à 0,5 Log. Ces variantes permettent donc de réaliser les essais de traitements. Les variantes contenant le pyrophosphate du fer et l'eau Brita ont été écartées du fait des réactions entre le fer et l'H₂O₂ pour le premier et de l'absence de matière organique pour le deuxième. En effet, il est important de réaliser ces essais dans des conditions proches des conditions réelles notamment en termes de concentrations de matières organiques. Nous avons donc choisi l'utilisation du BYE dépourvu de pyrophosphate de fer, dilué au 1/10 et qui a permis d'obtenir un faible abattement (0,12 Log). Les concentrations résiduelles des *Lp* obtenus (environ 7,8 Log) permettront donc de mettre en évidence les effets éventuels des traitements biocides. De plus, la cinétique de dégradation de l'H₂O₂ dans ce milieu est similaire à celle observée dans l'eau Brita.

IV.2.10.4 Cinétique de dégradation de l'H₂O₂ dans le BYE modifié

Une cinétique de dégradation de l'H₂O₂ sous l'effet des radiations UV a été réalisée dans le milieu BCYE retenu pour les expériences de traitements, afin de mesurer la vitesse de dégradation de l'H₂O₂ par les UV et de compenser cette dégradation par un flux d'H₂O₂. Ce flux permettra de maintenir la concentration de l'H₂O₂ à la concentration ciblée. La figure 65 représente la cinétique de dégradation de l'H₂O₂ dans les conditions réelles des traitements.

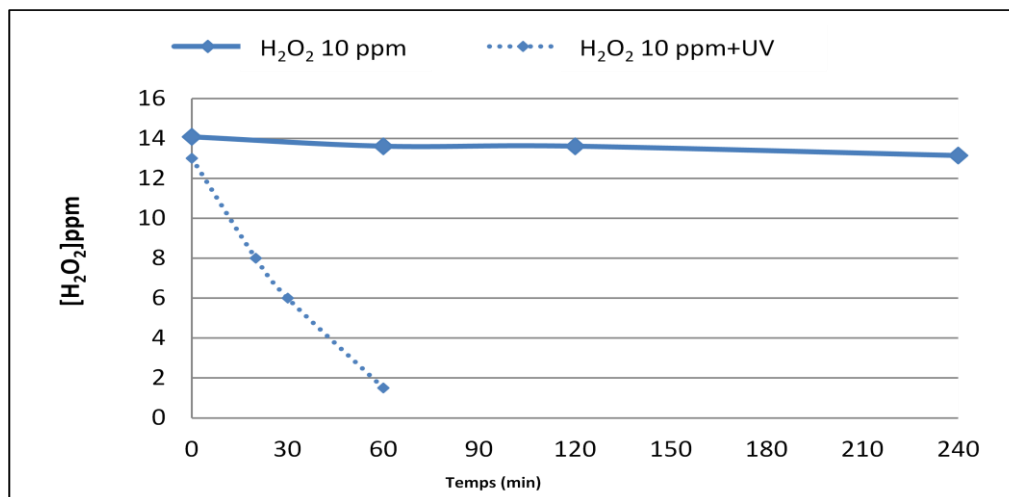


Figure 65 : Cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ à 10 ppm en absence (courbes continues) et en présence (courbe en pointillés) des UV

Cette cinétique a donc permis de calculer la vitesse de dégradation de l'H₂O₂ par les UV qui est d'environ 10 ppm/h. Un flux compensatoire de 10 ppm/h est donc nécessaire pour le maintien de la concentration d'H₂O₂ à la valeur ciblée.

IV.2.10.4.1 Effet des UV et du couple H₂O₂/UV

Les traitements biocides ont été réalisés dans le dispositif expérimental décrit dans « Matériels et méthodes ». Les résultats des traitements à 5 ppm d'H₂O₂ seul, aux UV (60 mJ/cm², 245 nm) seul et à l'H₂O₂ (5 ppm)/UV (60 mJ/cm², 245 nm) sont présentés dans la figure 66.

Le traitement à l'H₂O₂ seul à une concentration de 5 ppm semble n'avoir aucun effet significatif sur les concentrations des *Lp* (sg1) quelle que soit la souche traitée. Dans le cas des deux autres traitements, les concentrations des *Lp* baissent drastiquement durant les 5 premières minutes de traitement à l'UV et à l'H₂O₂/UV, puis, aucune diminution supplémentaire n'a été observée à partir de 20 min de traitement. Les traitements aux UV et à l'H₂O₂/UV aboutissent à des taux de mortalité > 99%. La performance de l'H₂O₂/UV semble supérieure à celle des UV seuls, mais les différences ne sont pas significatives pour tous les points de prélèvement, notamment pour les souches LAXB6 et 8. L'ajout de 5 ppm d'H₂O₂ aux UV améliore la performance du traitement d'environ 1 Log d'abattements quelle que soit la souche traitée (différences non significatives pour LAXB6 et 8).

■ H₂O₂ (5 ppm)/UV (60mj/cm², 245 nm)
 ■ UV (60mj/cm², 245 nm)
 ■ H₂O₂ (5 ppm)

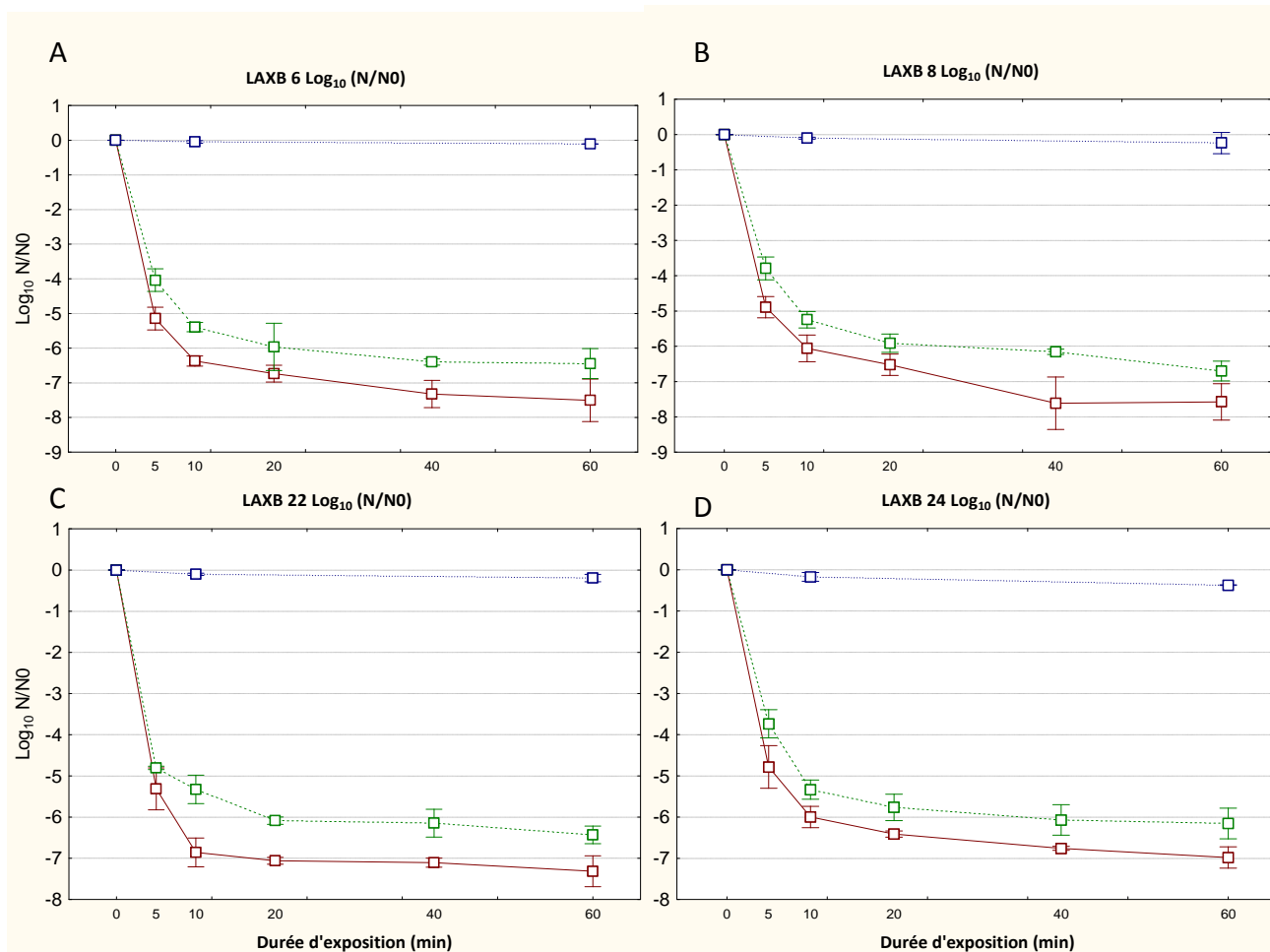


Figure 66 : Effet de l'H₂O₂ à 5 ppm (courbes bleues), des UV (courbes vertes) et de l'H₂O₂ (5 ppm)/UV (courbes rouges) sur l'inactivation des souches environnementales de *L. pneumophila* sg 1 dans le milieu BYE sans pyrophosphate de fer III dilué au 1/10 : (A) souche LAXB6, (B) souche LAXB8, (C) souche LAXB22, (D) souche LAXB24. Les points et les barres d'erreurs représentent les moyennes et les écarts types de 4 mesures réalisées dans deux expériences indépendantes.

IV.2.10.4.2 Effet des concentrations d' H₂O₂

Dans cet essai les suspensions de *Lp1* ont été soumises à trois concentrations d'H₂O₂ : 5, 10 et 20 ppm. La culture a été réalisée sur un milieu BCYE sans pyrophosphate de fer (fer III) dilué au 1/10 à une température de 28°C. La concentration initiale des bactéries était d'environ 2.5 x 10⁸ UFC/mL. Les résultats de l'effet de ces 3 concentrations d'H₂O₂ : 5, 10 et 20 ppm sur les concentrations des *Lp* (sg1) cultivables sont présentés dans la figure 67.

□ H₂O₂ (5 ppm)
 □ H₂O₂ (10 ppm)
 □ H₂O₂ (20 ppm)

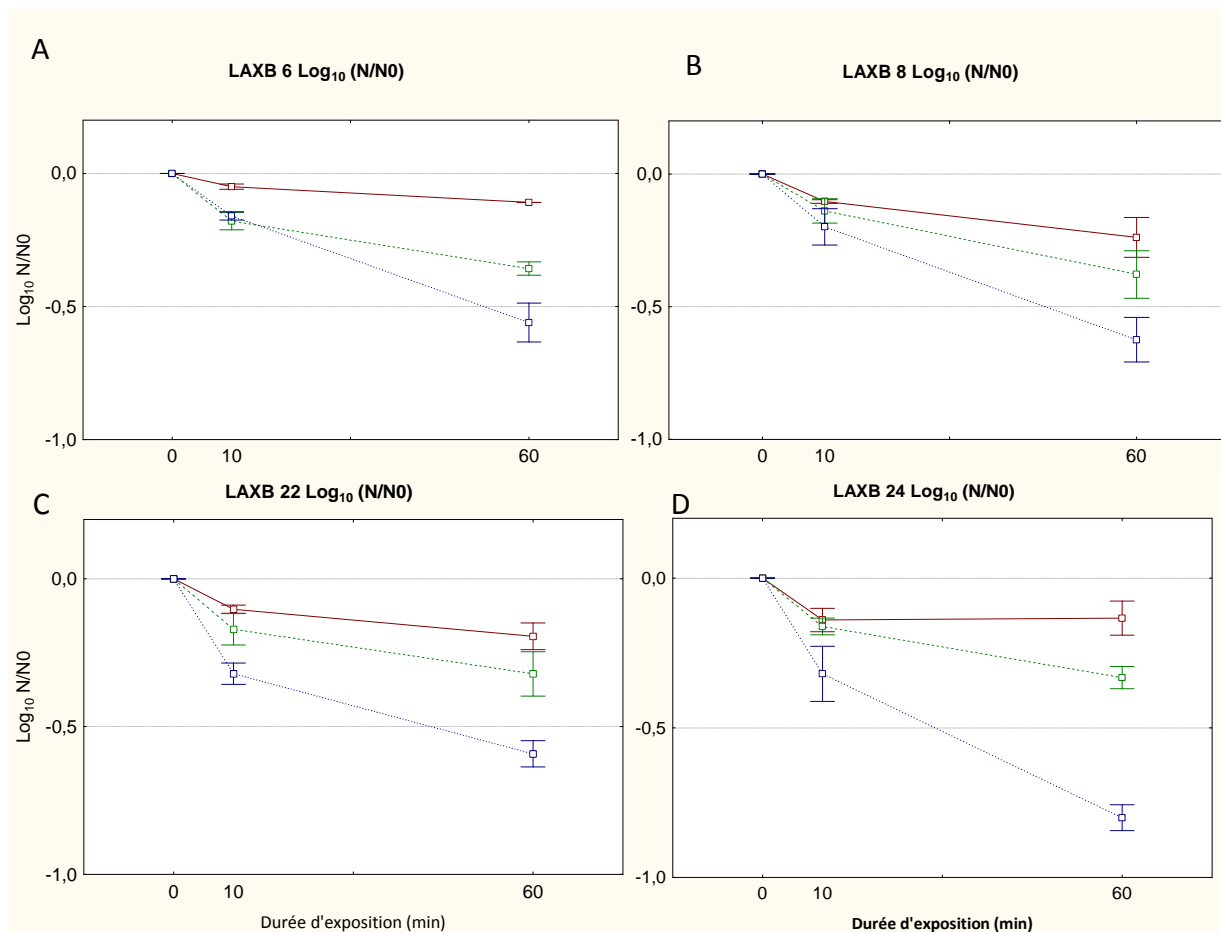


Figure 67 : Effet de l’H₂O₂ à 5 ppm (courbes rouge), à 10 ppm (courbes vertes) et de 20 ppm (courbe bleues) sur l’inactivation des souches environnementales de *L. pneumophila* sg 1 dans le milieu BYE sans Pyrophosphate de fer III dilué au 1/10 : (A) souche LAXB6, (B) souche LAXB8, (C) souche LAXB22, (D) souche LAXB24. Les points et les barres d’erreurs représentent les moyennes et les écarts types de 4 mesures réalisées dans deux expériences indépendantes.

L’augmentation de la concentration de l’H₂O₂ de 5 à 10 et à 20 ppm améliore l’efficacité de l’H₂O₂ mais cette efficacité reste faible et représente moins de 1 Log d’abattements de la viabilité. Le tableau 17 présente les résultats de l’effet de l’ensemble des traitements sur les concentrations des *Lp* cultivables.

Tableau 17 : Effet des traitements biocides sur la viabilité de *L. pneumophila* sg 1

Traitement	Temps de réaction (min)	Réduction de la viabilité (Log ₁₀ UFC/ml)*			
		LAXB6	LAXB8	LAXB22	LAXB24
H ₂ O ₂ (5 ppm)	60	0,11	0,24	0,19	0,13
H ₂ O ₂ (10 ppm)	60	0,36	0,38	0,37	0,33
H ₂ O ₂ (20 ppm)	60	0,56	0,68	0,59	0,69
H ₂ O ₂ (5 ppm)/UV**	60	7,51	7,58	7,31	7,08
UV**	60	6,44	6,70	6,40	6,16

*Nombre de Log éliminé après 60 min d’application

**UV appliquées à 60 mJ/cm² à 254 nm

Ces résultats montrent que l’effet de l’H₂O₂ seul est proportionnel à sa concentration, mais peu efficace par rapport aux traitements UV et H₂O₂/UV. Ces deux traitements aboutissent à une mortalité de > 99% et à des abattements d’environ 6,5 Log et 7,5 Log, respectivement. L’ajout de 5

ppm d'H₂O₂ aux UV améliore donc la performance de ce dernier d'un Log d'abattement supplémentaire. La sensibilité de toutes les souches testées est similaire.

IV.2.10.5 Effet des traitements biocides H₂O₂/UV et UV sur la virulence des isolats environnementaux de *L. pneumophila* sg 1

Il a été impossible de réaliser des tests de cytotoxicité sur l'ensemble de souches traitées dans le temps imparti. La cytotoxicité de deux isolats environnementaux de *L. pneumophila* sg 1, LAXB8 et LAXB24 traités à l'H₂O₂ couplé aux UV et aux UV seuls pendant 60 minutes a été réalisée vis-à-vis de l'amibe *A. castellanii*. Les colonies issues des traitements biocides de ces deux souches ont été récoltées sur le milieu BCYE et conservées dans des cryotubes à -20°C jusqu'au jour des tests, effectuées deux fois lors de deux essais indépendants et comparés à la cytotoxicité des souches non traitées et de la souche clinique *L. pneumophila* Lens (sg1). Les mêmes conditions de conservation ayant été appliquées aux souches traitées et non traitées notamment en termes de nombre de repiquages. La figure 68 présente les résultats de la cytotoxicité après 60 min d'exposition aux traitements.

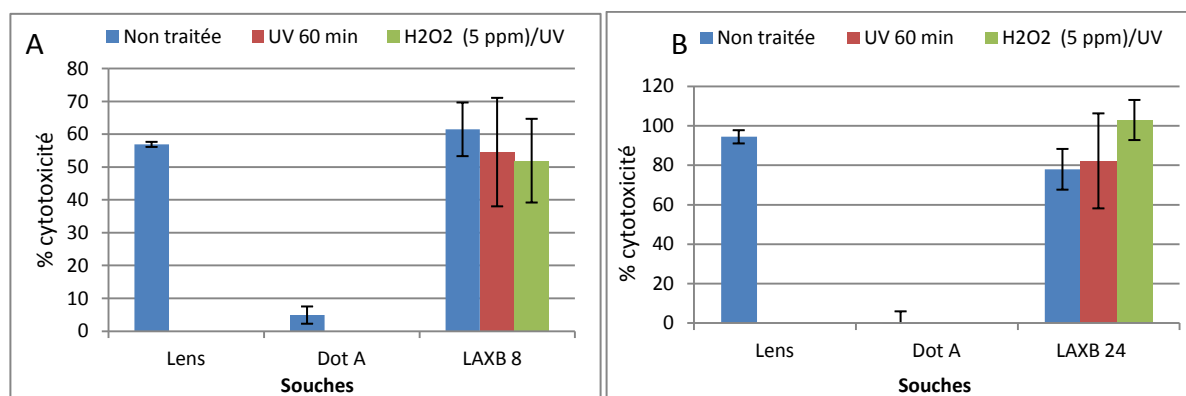
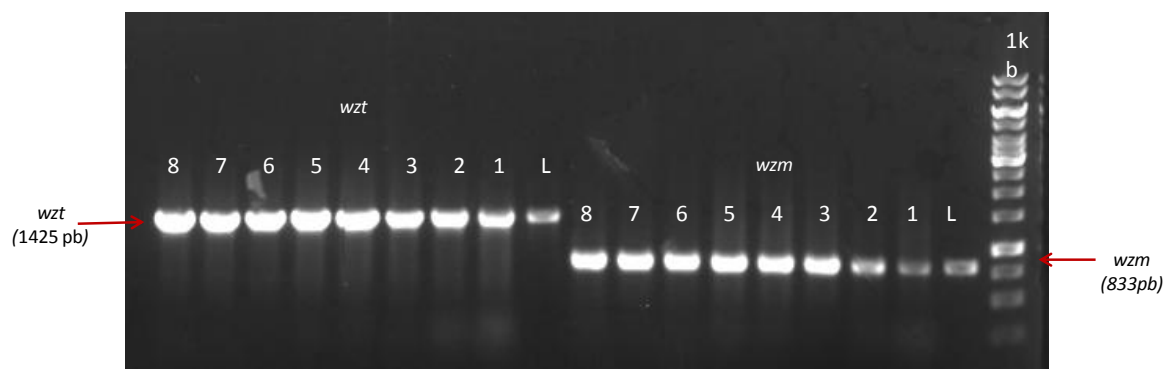


Figure 68 : Cytotoxicité des souches LAXB8 (A), LAXB24 (B) traitée et non traitée, de la souche clinique *L. pneumophila* Lens et du mutant *dotA* vis-à-vis de l'amibe *A. castellanii*. Les points et les barres représentent respectivement les moyennes et les écarts types calculés à partir de deux essais indépendants, les mesures sont réalisées en triplicat à chaque essai.

Ces résultats démontrent que la cytotoxicité des deux souches LAXB8 et LAXB24 ne varie pas sous l'effet des traitements. Aucune différence significative n'a en effet été détectée entre la cytotoxicité des souches parentale non traitées et celle des souches traitées aux UV et à l'H₂O₂/UV. Il faut noter ici que la virulence a été réalisée après la conservation à -20°C et un repiquage sur BCYE des souches ce qui a pu modifier les caractéristiques physiologiques des souches sortant du traitement biocide. Pour des raisons techniques, l'essai de cytotoxicité n'a pas pu être réalisé directement à l'issu des essais de traitements.

IV.2.10.6 Détection de mutation après les traitements biocides H₂O₂/UV et UV

Les gènes *ARNr 16s*, *mip*, *wzm* et *wzt* ont été amplifiés et les amplicons ont été purifiés et séquencés. La figure 69 présente les résultats de la migration des produits PCR des gènes *wzm* et *wzt*.



Désignation souches	L	1	2	3	4	5	6	7	8
souches	Lens	LAXB24	LAXB24	LAXB24 UV	LAXB24 H ₂ O ₂ /UV	LAXB8	LAXB8	LAXB8 UV	LAXB8 H ₂ O ₂ /UV

Figure 69 : Gel d'électrophorèse montrant les produit PCR des gènes *wzm* et *wzt* après migration

Les PCR des gènes *ARNr 16s*, *mip*, *wzm* et *wzt* sont toutes positives. Les séquences des gènes *mip*, *wzm*, *wzt* et l'*ARN 16s* des souches LAXB8 et 24 traitées aux UV et à l'H₂O₂/UV ont été alignées à l'aide du logiciel en ligne ClustalW2. Les alignements montrent que les séquences des 3 gènes *wzm*, *wzt* et l'*ARNr 16s* ne présentent aucune mutation. De même, le séquençage du gène *mip* de la souche LAXB8 traitée aux UV et à l'H₂O₂/UV n'a révélé aucune mutation. Par contre la séquence du gène *mip* de la souche LAXB24 traité aux UV et à l'H₂O₂/UV a révélé la présence d'une mutation en position 391 où le nucléotide Cytosine (C) a été substitué par le nucléotide Thymine (T). Cette mutation est l'unique mutation détectée lors du séquençage de l'ensemble des gènes cités ci-dessous. Il est évident que le nombre des analyses réalisées (2 essais) et le nombre de gènes séquencés sont beaucoup trop petits pour qu'une conclusion puisse être avancée au sujet d'un effet mutagène des traitements. On peut également supposer que l'intensité des radiations UV est trop grande et aboutit à la mortalité cellulaire. La diminution de l'intensité du traitement et l'augmentation du temps d'exposition pourrait probablement favoriser l'apparition de mutations. Cependant, il est préconisé d'analyser un plus grand nombre de souches et de séquencer un plus grand nombre de gènes pour pouvoir avancer de conclusions à propos de l'effet mutagène des UV dans ces conditions expérimentales. Ce séquençage a permis d'obtenir deux séquences du gène *wzm*, une séquence du gène *wzt* et une séquence du gène *ARNr 16S*. Il est donc possible de comparer ces séquences non motées avec les séquences des mêmes gènes des souches cliniques de référence. Les tableaux 18, 19 et 20 présentent les pourcentages d'homologie des séquences des gènes *ARNr 16s*, *wzm* et *wzt*, respectivement, des souches environnementales LAXB8 et 24 et des souches cliniques de référence.

Chapitre IV : Isolement et caractérisation des légionelles de la source « Soufre »

Tableau 18 : Homologies des séquences du gène *ARNr 16s* des souches cliniques de *L. pneumophila* ssp Alcoy, Corby, Paris, Philadelphia, Lens et des souches environnementales *L. pneumophila* sg 1 LAXB8 et 24 obtenues par le logiciel MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/>)

	<i>L. pneumophila</i> LAXB8-24 (sg1)	<i>L. pneumophila</i> Alcoy	<i>L. pneumophila</i> Corby	<i>L. pneumophila</i> Paris	<i>L. pneumophila</i> Philadelphia
<i>L. pneumophila</i> LAXB8-24 (sg1)					
<i>L. pneumophila</i> Alcoy	99,9989				
<i>L. pneumophila</i> Corby	100	99,9989			
<i>L. pneumophila</i> Paris	99,9989	99,9978	99,9989		
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia	99,9989	99,9978	99,9989	100	
<i>L. pneumophila</i> Lens	99,9978	99,9989	99,9978	99,9989	99,9989

Tableau 19 : Homologie des séquences du gène *wzm* des souches cliniques de *L. pneumophila* ssp Alcoy, Corby, Paris, Philadelphia, Lens et des souches environnementales *L. pneumophila* sg 1 LAXB8 et 24 obtenues par le logiciel MEGA 5

	<i>L. pneumophila</i> LAXB8 (sg1)	<i>L. pneumophila</i> LAXB24 (sg1)	<i>L. pneumophila</i> Paris	<i>L. pneumophila</i> Lens	<i>L. pneumophila</i> Corby	<i>L. pneumophila</i> Alcoy
<i>L. pneumophila</i> LAXB8 (sg1)						
<i>L. pneumophila</i> LAXB24 (sg1)	99,9994					
<i>L. pneumophila</i> Paris	100	99,9994				
<i>L. pneumophila</i> Lens	99,9949	99,9956	99,9949			
<i>L. pneumophila</i> Corby	99,9987	99,9994	99,9987	99,9949		
<i>L. pneumophila</i> Alcoy	99,9975	99,9981	99,9975	99,9962	99,9975	
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia	100,0000	99,9994	100	99,9949	99,9987	99,9975

Tableau 20 : Homologies des séquences du gène *wzt* des souches cliniques de *L. pneumophila* ssp Alcoy, Corby, Paris, Philadelphia, Lens et des souches environnementales *L. pneumophila* sg 1 LAXB8 et 24 obtenues par le logiciel MEGA 5

	<i>L. pneumophila</i> LAXB8-24 (sg1)	<i>L. pneumophila</i> Paris	<i>L. pneumophila</i> Lens	<i>L. pneumophila</i> Corby	<i>L. pneumophila</i> Alcoy
<i>L. pneumophila</i> LAXB8-24 (sg1)					
<i>L. pneumophila</i> Paris	100				
<i>L. pneumophila</i> Lens	99,9924	99,9924			
<i>L. pneumophila</i> Corby	99,9968	99,9968	99,9892		
<i>L. pneumophila</i> Alcoy	99,9837	99,9837	99,9804	99,9804	
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia	100	100	99,9924	99,9968	99,9837

Ces résultats montrent que les séquences des gènes *wzm* et *wzt* et l'*ARNr 16s* des souches environnementales présentent un fort pourcentage d'homologie avec celles des souches de références disponibles dans les bases de données (<http://genolist.pasteur.fr/LegioList>). Néanmoins, il est possible de distinguer les souches environnementales des souches de référence sur la base de ces séquences. Les séquences des gènes *wzm* et *wzt* de la souche *L. pneumophila* ssp Paris représente une homologie de 100 % avec les séquences *wzm* de la souche LAXB8 et *wzt* des souches LAXB8 et 24, respectivement. Bien que ces deux gènes aient été séquencés uniquement pour deux souches environnementales de sg1 et ne soient pas utilisés dans les études phylogéniques

des *Lp*, nos résultats suggèrent qu'ils pourraient également servir d'outil pour l'identification et la classification des souches de sg1.

IV.3 Discussion

Plusieurs cas successifs de légionellose ont été découverts à Aix Les Bains de 1986 à 1997. L'enquête épidémiologique menée pour découvrir l'origine de ces cas a révélé que certaines sources thermales utilisées dans des spas, notamment la source Soufre, étaient contaminées par des légionelles et que cette contamination était persistante. Selon nos résultats qui montrent un niveau élevé de virulence des isolats environnementaux, cette persistance serait due à un fort pouvoir infectieux de ces légionelles vis-à-vis des protozoaires de cet environnement particuliers. 12 ans après la première étude menée par Molmeret *et al.* (2001) pour l'isolement des légionelles de ces sources, nous avons de nouveaux isolé et étudié les légionelles à partir de biofilms développés sur des lames de verre immergées dans la source Soufre. Cette approche est différente des approches utilisées lors des études précédentes qui se sont focalisées sur l'étude des légionelles en suspension isolées à partir d'échantillons d'eau et collectées des différents sites du spas (Bornstein *et al.*, 1989; Molmeret *et al.*, 2001).

L'approche de caractérisation phénotypique basée sur des critères morphologiques et physiologiques a permis de faire un premier criblage. Cette approche a permis, notamment grâce au test catalase *in situ* de sélectionner l'espèce *pneumophila*. En effet, *L. pneumophila* dispose de deux gènes, *kata* et *katB*, codant pour une catalase-peroxydase mais d'un point de vue fonctionnelle ces enzymes, expriment uniquement l'activité peroxydase (Brandyopadyay *et al.*, 1998 ; 2000). Seule une très légère activité catalase a été mise en évidence chez les isolats de *L. pneumophila*, comme déjà décrit par le Pine *et al.* (1984) ; ce qui permet de considérer ce phénotype comme négatif (Cat⁻) (les souches de *Lp* ont été notées cat⁺ dans les résultats afin de les différencier du témoin négatif cat⁻ qui ne possède aucune activité catalase, même légère). Les autres espèces de *Legionella* testées lors de notre étude ont un phénotype cat⁺. En conclusion le test catalase est un bon marqueur pour le criblage de *L. pneumophila* dans le genre *Legionella*.

Notre démarche expérimentale d'isolement et de criblage de *L. pneumophila* à partir de biofilms naturels a permis de caractériser la population de *L. pneumophila* des biofilms de la source S. Le sérotype 12 apparaît comme majoritaire dans les biofilms.

Des isolats environnementaux *Lp1* ont déjà été isolés des échantillons d'eau prélevés de la source Soufre alors que les sg 10 et 12 n'ont jamais été isolés de cette source. Malheureusement, les souches *Lp1*, précédemment isolées de cette source en 1988 et 1999 n'ont pas été conservées. Par conséquent, il nous a été impossible de déterminer si les souches de *Lp1* que nous avons isolées sont les mêmes souches que celles isolées précédemment ou si elles résultent d'une éventuelle évolution génétique d'une seule souche parentale.

Les 3 profil d'ADN des isolats environnementaux *Lp1* obtenus par PFGE sont originaux et ne correspondent à aucun profil de *Lp1* cliniques impliquées dans des cas de légionellose répertoriés. Ces isolats sont de plus caractérisés par un pouvoir infectieux vis-à-vis des amibes supérieur à celui des souches cliniques. Notre étude a démontré par ailleurs la persistance à long terme des *Lp1* dans la source Soufre. Il est donc possible de supposer que ce niveau de virulence élevé vis à vis des amibes est à l'origine de leur persistance dans le biofilm de la source Soufre.

L'étude moléculaire des 15 isolats de *Lp12* suggère que ces isolats correspondent à une souche unique. En effet, les profils PFGE (PST) et le séquençage du gène *mip* révèlent que ces isolats appartiennent à un même PST et possèdent la même séquence du gène *mip*, en l'occurrence le PST3 et la séquence *mip2*. De plus, la virulence des isolats *Lp12* ne permet pas de les différencier puisque ils possèdent une cytotoxicité similaire vis-à-vis d'*A. castellanii*. Le séro groupe 12 n'a jamais été rapporté dans les études précédentes, et aucun cas de légionellose impliquant ce séro groupe n'a été identifié dans ce site. Il faut cependant noter qu'une souche *Lp12* a déjà été isolée dans des cas de légionellose humaine (Thacker *et al.*, 1987 ; Amaro *et al.*, 2012). La cytotoxicité élevée de *Lp12* vis à vis d'*A. castellanii* suppose que la persistance des *Lp12* dépend des protozoaires présents dans le biofilm de la source Soufre. De plus notre étude de coinfection *Lp12/Lp1* (LAXB2/LAXB24) montre un avantage de propagation dans l'amibe pour la souche *Lp12*. Toutes ces données suggèrent une probable apparition récente d'une unique souche *Lp12* présentant un avantage particulier à son développement dans le biofilm. Ceci permettrait également d'expliquer l'absence de *Lp12* en suspension lors des études précédentes (Bornstein *et al.*, 1989; Molmeret *et al.*, 2001). Les 5 isolats *Lp10* appartiennent à deux classes différentes selon la séquence du gène *mip* et cela suggère qu'il s'agit de deux souches différentes.

La virulence de ces isolats vis à vis des macrophages humains n'a pas pu être testée lors de notre étude, mais il est clairement reconnu que la multiplication intracellulaire des *Lp1* dans les amibes augmente leur pouvoir pathogène vis-à-vis des macrophages alvéolaires humains (Neumeister *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que ces souches environnementales de *Lp1* pourraient être à l'origine de légionelloses répertoriées à Aix Les Bains. Cette source thermique n'est plus utilisée pour les stations de thermalismes mais demeure une source de légionelles puisque elle déverse l'eau dans le réseau aixois qui lui-même rejoint le Lac du Bourget au niveau de la plage municipale qui possède un jet d'eau opérationnel en saison estival.

L'étude *in vitro* de l'effet des traitements sur les souches environnementales de *Lp1* a révélé que les traitements aux UV et au couple H_2O_2/UV sont beaucoup plus efficaces que l' H_2O_2 seul vis-à-vis des légionelles en suspension. Ces traitements permettent d'éliminer plus de 99% de cellules cultivables. L'application de l' H_2O_2 seule, ne donne pas de résultats satisfaisants aux concentrations testées, mais l' H_2O_2 couplé aux UV, accroît la performance du procédé. En effet, la photolyse de l' H_2O_2 par les radiations UV génère des radicaux OH^\bullet libres qui sont les espèces les plus réactives parmi les ROS (Reactive Oxygen Species). Ce sont donc ces radicaux qui seraient à l'origine de la performance plus élevée du couple H_2O_2/UV par rapport à celle des UV seuls.

Ces résultats sont en adéquation avec les études de Muraca *et al.* (1987) et de Domingue *et al.* (1988). Muraca *et al.* (1987) montrent que l'irradiation continue d'une suspension de *Lp* par des UV à $30,000 \text{ uW-s/cm}^2$, aboutit à une réduction de 5 Log de la concentration des *Lp* après 20 min d'application. Aucune autre inactivation de *Lp* n'a été observée au delà de 20 min et la concentration des *Lp* se stabilise entre 10^2 et $2 \cdot 10^2$ UFC/ml. Dans la même étude ils démontrent que les UV sont plus performant vis-à-vis des *Lp* que le traitement thermique, le chlore et l'ozone. En effet, ces 3 traitements nécessitent des durées d'application plus longues pour aboutir au même niveau d'inactivation des *Lp*.

Domingue *et al.* (1988) ont étudié l'effet de certains traitements oxydants vis-à-vis des *Lp* sg 1. Selon leurs résultats, l'ozone s'est révélé le plus performant, en effet l'application de 0,1 à 0,30 $\mu\text{g/ml}$ d'ozone pendant 5 min aboutit à 99% de mortalité. Une concentration d' H_2O_2 beaucoup plus élevée (1000 $\mu\text{g/ml}$) et une durée d'application plus importante (30 min) sont nécessaires pour

aboutir au même niveau de mortalité. Les concentrations que nous avons testées (5, 10 et 20 ppm) sont donc inefficace vis-à-vis des légionelles et confirment les résultats de Domingue *et al.* (1988).

Plusieurs études indiquent que *L. pneumophila* est exposé à H₂O₂ et /ou d'autres espèces réactives de l'oxygène au cours de la phagocytose. La réplication intracellulaire des mutant *KatA*⁻ et *KatB*⁻ diminue à un niveau similaire à celui du mutant *dotA* non virulent (Bandyopadhyay *et al.*, 2003). Bandyopadhyay *et al.* (1998 ; 2000 ; 2003) proposent un modèle dans lequel ces deux enzymes jouent un rôle dans le maintien des concentrations de l'H₂O₂ à des niveaux compatibles avec les fonctions cellulaires nécessaires au processus infectieux de cette bactérie, notamment le trafic intracellulaire assuré par les effecteurs du système de sécrétion de type IV. Ils identifient ces enzymes comme des facteurs de virulence dépendant de la phase de croissance et nécessaire à l'initiation de la réplication de *Lp* dans les macrophages. Pourtant, bien que ces deux enzymes soient responsables de la régulation des concentrations intracellulaires de l'H₂O₂ produit lors du processus respiratoire, elles ne sont pas induites par un ajout exogène d'H₂O₂. Selon Bandyopadhyay *et al.* (2003) *Lp* ne développe donc pas de réponse adaptative vis-à-vis de l'H₂O₂ exogène et serait donc plus sensible à ce biocide que d'autres bactéries, notamment *E. coli*.

L'efficacité expérimentale de ces procédés vis-à-vis des légionelles en suspension ne reflète pas la performance de ce procédé dans les conditions d'applications réelles. Le biofilm représente le principal habitat des légionelles qui résistent alors mieux à l'action des biocides que les légionelles planctoniques. Il est important donc de considérer cet aspect pour l'application de ces procédés en conditions réelles.

Nos résultats démontrent que l'application des UV (en présence ou en absence de l'H₂O₂) dans les conditions testées génère une seule mutation au niveau du gène *mip* des souches LAXB24 traitées. Ce résultat a été retrouvé lors de deux essais indépendants. Cette mutation correspond à une substitution du nucléotide Cytosine par le nucléotide Thymine à la position 391. Aucune autre mutation n'a été détectée dans les séquences des autres gènes séquencés (*ARN 16s*, *wzm*, *wzt*). Cependant, il est difficile de considérer ce seul résultat pour évaluer la fréquence de mutation. Une analyse plus complète incluant un nombre suffisamment élevé de souches et un plus grand nombre de gènes, serait nécessaire. Une possibilité serait de réaliser le séquençage du génome complet de la souche parentale et de la souche traitée pour estimer correctement la fréquence de mutation induite par ce traitement.

Une fréquence de mutation élevée pouvant conduire à des souches plus résistantes aux biocides ou plus virulentes, représente donc un inconvénient de l'application de ce traitement qui devrait être dans ces cas germicide à 100% afin de prévenir les conséquences d'éventuelles mutations.

Il faut garder aussi en mémoire que le dispositif expérimental que nous avons mis au point pour des applications industrielles minimise le risque de mutations des bactéries sessiles. En effet, dans ce dispositif, les biofilms ne sont pas directement exposés aux UV. D'ailleurs, l'analyse des séquences *mip* des souches isolées de biofilms traités aux UV et à l'H₂O₂/UV lors des essais PEROX utilisant ce dispositif ne montre aucune mutation.

Nous avons testé la virulence des souches de *Lp* environnementales LAXB8 et 24 survivantes aux traitements biocides étudiés par un test de cytotoxicité vis-à-vis de l'amibe *A. castellanii*. Nos résultats démontrent que les traitements biocides appliqués ne modifient pas la virulence des souches de *L. pneumophila* sg 1 dans les conditions de nos expériences (notamment, la durée d'application des traitements). La virulence des souches LS (isolées des biofilms traités) a également

été testée et les résultats ne montrent aucune modification de la virulence des souches traitées lors des expériences PEROX par rapport aux souches non traitées.

Enfin, le séquençage du gène *mip* confirme que ce gène est un bon marqueur pour la détermination des souches de *L. pneumophila* et les études phylogénétiques. De plus, les gènes *wzm* et *wzt*, spécifiques au sg 1 représentent également de bons marqueurs de ce sg 1 et permettent par le séquençage de distinguer les différentes souches de *L. pneumophila sg1*. D'ailleurs Mérault *et al.* (2011) montrent que ces deux gènes représentent des candidats potentiels pour le développement de méthodes de quantification de *L. pneumophila sg 1* par PCR-Q.

Une partie des résultats obtenus sur la composition de ces biofilms en *Legionella* a fait l'objet d'une publication dans le journal BMC Microbiology.

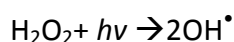
V- Mise au point du procédé PEROX pour le traitement du risque *Legionella* dans les tours aéroréfrigérantes :  tude expérimentale

V Chapitre V : Mise au point du procédé PEROX pour le traitement du risque Legionella dans les tours aéroréfrigérantes : étude expérimentale

V.1 Contexte de l'étude

Ce projet expérimental a été mené dans la perspective de l'étude des performances du procédé H₂O₂/UV pour le traitement du risque *L. pneumophila* dans les tours aéroréfrigérantes. Le couple H₂O₂/UV est largement utilisé dans le traitement des eaux potables et des eaux usées spécifiquement pour l'élimination de la matière organique (Sarathy *et al.*, 2006, Leach *et al.*, 2006). Cette matière organique indésirable et notamment les sous produits de désinfection peuvent être d'origine naturelle ou industrielle. Elle comporte en effet des polluants organiques tel que les phénols, les trihalométanes, les herbicides, les pesticides, les acides humiques et d'autres composés aromatiques (Wang *et al.*, 2000, 2006 ; Kusic *et al.*, 2006, Sarathy *et al.*, 2009 ; 2010). Ce procédé est principalement recherché pour ses capacités de dégradation des polluants organiques mais il est très peu utilisé pour ses capacités de désinfection proprement dites.

Le procédé H₂O₂/UV possède un fort potentiel pour l'élimination de la matière organique et les polluants organiques réfractaires (Wang *et al.*, 2000 ; 2006 ; Vilhunen *et al.*, 2010). Cette technologie combine des effets photolytiques directs et indirects des UV. Les effets directs sont liés à la photolyse des composés organiques par les radiations UV. Les effets indirects sont liés à la photolyse de l'H₂O₂ par les UV et qui aboutit au clivage des liaisons HO-OH, produisant ainsi des radicaux hydroxyles libre (OH[•]).



Le radical hydroxyle a une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde et constitue le dérivé le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La photolyse de l'H₂O₂ par les UV est un processus rapide, les radicaux libres ainsi générés réagissent avec les composés organiques et les microorganismes d'une manière non sélective.

Bien que les UV et le peroxyde d'hydrogène soient largement utilisés comme solution de désinfection, l'utilisation du couple H₂O₂/UV pour la désinfection des eaux et la réduction des risques microbiologiques est encore limitée. Nous ne connaissons, à ce jour, aucune application de ce procédé pour le traitement du risque légionelle dans les tours aéroréfrigérantes.

Notre étude porte donc sur l'étude de la performance du couple H₂O₂/UV pour le traitement du risque légionelles dans les tours aéroréfrigérantes. L'étude de la performance de ce procédé est réalisée sur des biofilms naturellement contaminés par des légionelles. Nous nous intéressons également aux effets des biocides sur les protistes dont certains constituent un réservoir protecteur de *L. pneumophila* vis-à-vis de l'action des biocides. Ces protistes constituent également des sites de réplication des légionelles et permettent leur dissémination en grand nombre d'où les problèmes de re-contamination des tours. Ainsi la mise au point des conditions d'application de ce traitement vis-à-vis des biofilms permettrait de résoudre le problème de la re-contamination des tours par *L. pneumophila* en détruisant leur principal habitat.

L'objectif de cette étude expérimentale est donc d'évaluer l'efficacité du couple H₂O₂/UV pour les traitements des biofilms et de déterminer les conditions d'application pour une performance optimale du point de vue biologique pour une utilisation en grandeur réelle (industrielle).

V.2 Résultats

V.2.1 Effet des traitements PEROX sur les communautés microbiennes planctoniques et fixées (biofilms)

V.2.1.1 Adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire

Deux expériences d'acclimatation des biofilms aux conditions de laboratoire ont été réalisées. En effet, ces biofilms étant issus d'un écosystème environnemental particulier, il a été nécessaire d'étudier leur comportement après leur transfert dans les conditions de laboratoire avant de les soumettre aux traitements biocides. Cette étude d'acclimatation permet également de déterminer la durée nécessaire pour la stabilisation de ces biofilms, c'est après cette stabilisation que les traitements biocides ont été appliqués.

La première expérience a été réalisée à une concentration de tryptone de 5 ppm (COD). Au cours de cette essai, et grâce à la disponibilité nutritionnelle, un développement microbien au sein du biofilms a eu lieu. En effet, les concentrations des différents indicateurs analysés ont considérablement augmentées. Par conséquent, l'essai a été abandonné car l'objectif de ces essais est principalement la mise au point des conditions de laboratoire permettant le maintien et la stabilisation des biofilms. De plus la croissance des biofilms telle qu'elle a été observée durant cet essai aurait pu masquer les effets des traitements.

La deuxième expérience a été réalisée à une concentration de matière organique de 3 ppm (COD). Cette matière organique est constituée d'1/3 de tryptone et de 2/3 d'acides humiques. Deux essais ont été réalisés lors de cette expérimentation selon le même schéma expérimental à l'exception des volumes des réservoirs d'eau de recirculation qui sont de 20 et 100 litres. Trois indicateurs biologiques du biofilm ont été analysés afin de déterminer la phase de stabilisation des biofilms. Les analyses ont été effectuées à raison de 3 échantillons par prélèvement (triplicat). Les points et les barres d'erreurs présentés sur les graphiques sont donc les moyennes et les écarts type de 3 mesures, respectivement.

V.2.1.1.1 Activité métabolique

La figure 70 représente l'évolution des concentrations de l'ATP mesurées au cours des deux essais d'acclimatation des biofilms.

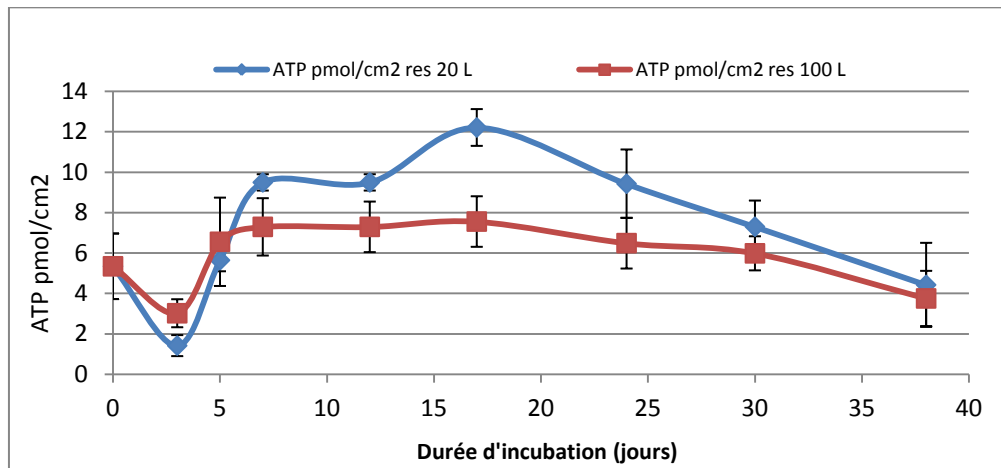


Figure 70 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm²) après le transfert des biofilms dans les réacteurs biologiques associés à un réservoir d'eau de 20 litres (courbe bleue) et de 100 litres (courbe rouge)

Les concentrations de l'ATP diminuent dans un premier temps jusqu'à J3, probablement en relation avec une phase de latence durant laquelle les biofilms s'adaptent à ces nouvelles conditions. Elles augmentent de nouveau pour se stabiliser ensuite dès 5 jours d'incubation dans l'essai de 100 L et dès 7 jours d'incubation dans l'essai de 20 L. Une légère baisse est toutefois observée dès 24 jours d'incubation. L'évolution des concentrations de l'ATP est globalement similaire dans les deux essais.

V.2.1.1.2 Bactéries cultivables

L'évolution des concentrations des bactéries cultivables est présentée dans la figure 71.

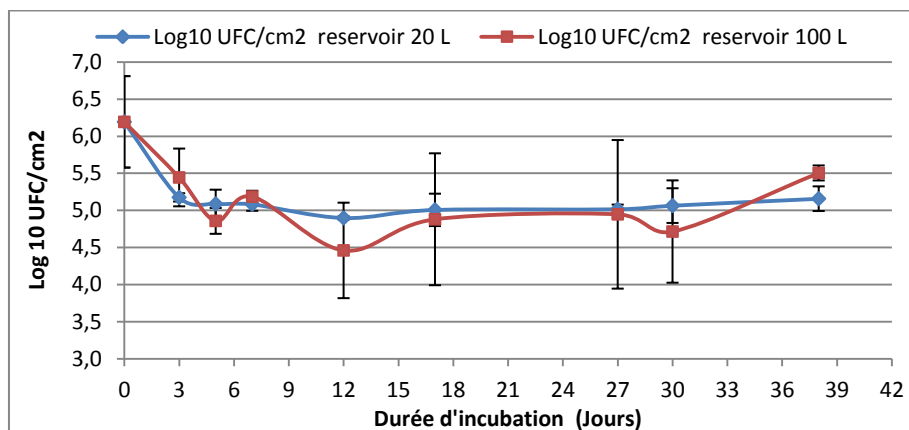


Figure 71 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) après le transfert des biofilms dans les réacteurs biologiques associés à un réservoir d'eau de 20 litres (courbe bleue) et de 100 litres (courbe rouge)

Pour cet indicateur, les concentrations diminuent également entre 0 et J5 puis se stabilisent dès J5. Ces concentrations restent stables jusqu'à la fin des essais avec quelques petites variations notamment pour l'essai à 100 L. L'évolution des concentrations des bactéries cultivables est similaire durant les deux essais.

V.2.1.1.3 Bactéries totales

L'évolution des concentrations des bactéries totales est présentée dans la figure 72.

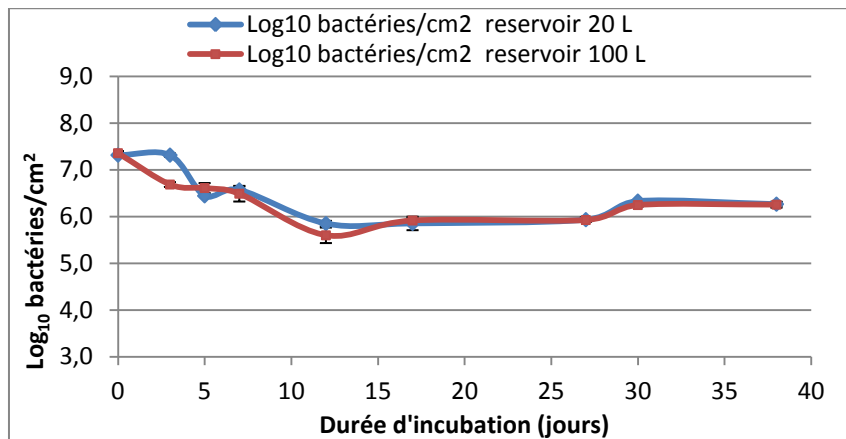


Figure 72 : Evolution des concentrations des bactéries totales (Log₁₀ bactéries /cm²) après le transfert des biofilms dans les réacteurs biologiques associés à un réservoir d'eau de 20 litres (courbe bleue) et de 100 litres (courbe rouge)

Les concentrations des bactéries totales diminuent également entre J0 et J12 puis se stabilisent dès J12. Ces concentrations restent stables jusqu'à la fin des essais (J38). La stabilisation des concentrations des bactéries totales est donc observée dès J12.

V.2.1.2 Détermination de la durée de la phase de stabilisation

Le transfert des biofilms dans les réacteurs biologiques implique un changement de leur habitat et des conditions environnementales auxquelles ils sont soumis. Les résultats de cet essai démontrent que les concentrations de l'ATP et des bactéries totales et cultivables diminuent après le transfert des biofilms dans les réacteurs. Ces diminutions seraient dues à la nécessité d'une phase de latence pour l'adaptation aux nouvelles conditions de l'expérimentation. Ces conditions impliquent, entre autre, un changement de source de nutriments, de température (régulée à 27-28°C par un thermoplongeur) et des forces hydrodynamiques appliquées dans les réacteurs par la rotation des carrousels (figure 73).

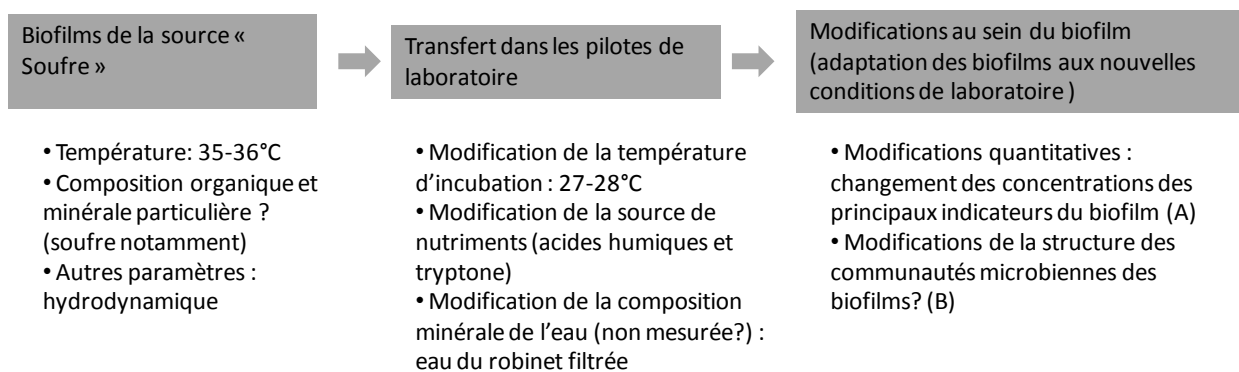


Figure 73 : Schéma récapitulatif des principales conditions d'incubation des biofilms dans le dispositif expérimental et leurs effets sur les biofilms (A : modifications constatées, B : modifications probables)

Ce résultat n'est pas anodin du fait que l'écosystème original des biofilms est très particulier et permet donc le développement des communautés microbiennes spécifiques.

La source « Soufre » est une source thermale soufrée, caractérisée par des teneurs en soufre très élevées et par une température de 35°C en moyenne. Les biofilms qui s'y développent sont donc habitués à cet écosystème particulier qui conditionne la composition, la concentration et la structure des différents constituants du biofilm. Nous n'avons pas réalisé d'analyses exhaustives de cet écosystème, car il ne s'agit pas de l'objectif de notre étude. Il est tout de même évident que les conditions retrouvées dans cet écosystème sont différentes des conditions de laboratoire. Ce sont ces différences qui sont à l'origine des modifications quantitatives des indicateurs des biofilms observées après le transfert de ces derniers dans les réacteurs biologiques. Le changement d'habitat des biofilms induit donc un changement de ces conditions impliquant ainsi un changement de communauté microbienne et/ou de l'activité métabolique des biofilms. Les communautés microbiennes favorisées dans la source Soufre se retrouvent dans un nouveau milieu différent de leur milieu original. Il est donc important de souligner que du fait de la spécificité de cet écosystème, il n'est pas exclu qu'un changement quantitatif (observé lors de nos essais) et qualitatif des populations microbiennes du biofilms s'opère après le transfert dans un nouveau milieu.

La stabilisation des indicateurs analysés après une certaine durée d'incubation dans les réacteurs (variable selon les indicateurs) démontre que les biofilms se sont adaptés à ces nouvelles conditions mais que ces conditions ne permettent pas la croissance des biofilms. La phase initiale constitue donc une phase d'adaptation durant laquelle les biofilms s'adaptent par des changements physiologiques à l'échelle du biofilm et des microorganismes, permettant le maintien des biofilms dans ces nouvelles conditions.

Les concentrations de l'ATP et des bactéries cultivables se stabilisent à partir de J5 alors que celle des bactéries totales ne se stabilisent qu'à partir de J12. C'est cette durée de stabilisation (J12), qui a été choisie comme période d'adaptation appliquée aux biofilms avant de les soumettre aux traitements biocides. Afin de s'affranchir des variations naturelles des biofilms au cours de l'expérimentation, les essais ont été réalisés en duplicats : à chaque expérience, un essai de traitement et un essai de référence durant lesquels les biofilms ont été soumis aux mêmes conditions de laboratoire.

V.2.1.3 Cinétique de dégradation de l'H₂O₂

Les cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ ont été effectuées dans les conditions du dispositif expérimental prévu pour les essais envisagés (cf. Matériels et Méthodes). Trois concentrations d'H₂O₂ en l'occurrence 10, 30 et 50 ppm ont été testées dans de l'eau brute pour les 3 concentrations et dans de l'eau supplémentée en matière organique uniquement pour les concentrations de 30 et 50 ppm d'H₂O₂. Ces cinétiques ont été réalisées en absence et en présence de radiation UV. Les résultats des cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ sont présentés dans la figure 74.

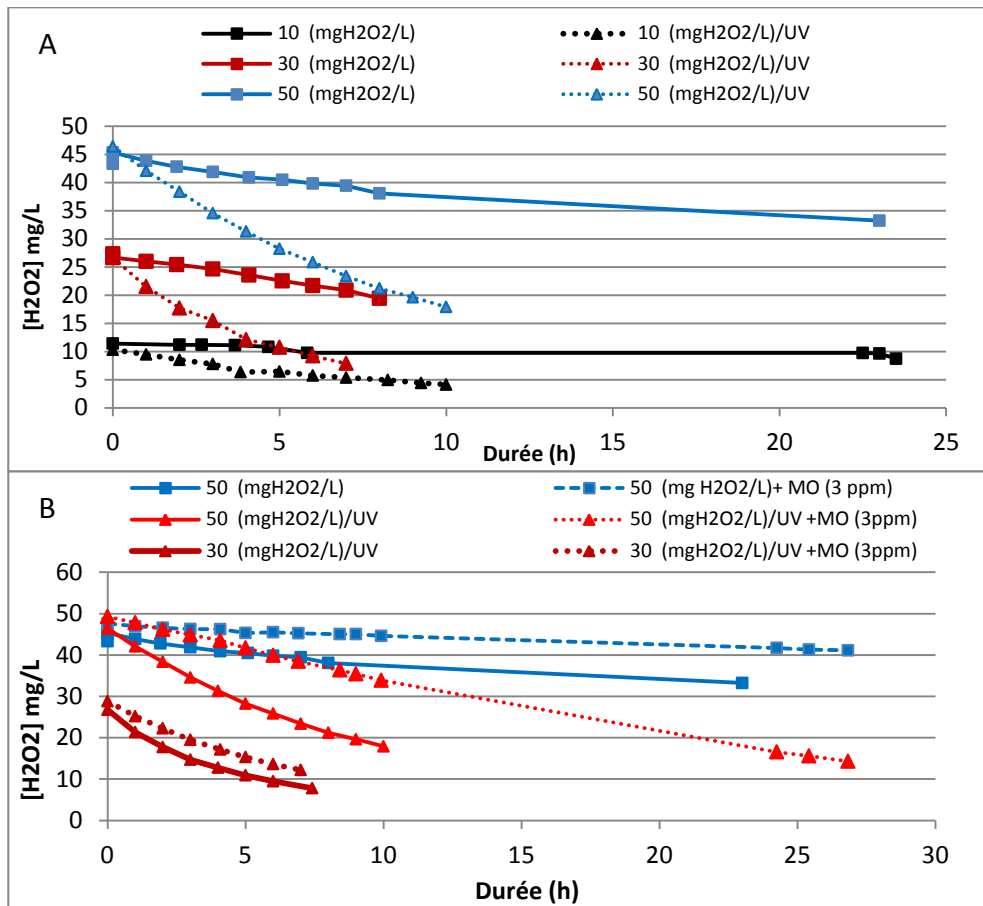


Figure 74 : Cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ (A) à 10, 30 et à 50 ppm dans de l'eau brute (B) à 30 et 50 ppm dans de l'eau brute et dans de l'eau supplémentée de matière organique. (MO : matière organique à 3 ppm de COD)

Les résultats présentés dans la figure 74 (A) correspondent aux cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ dans de l'eau brute en présence et en absence de radiation UV. Ces résultats montrent que quelle que soit la concentration de l'H₂O₂ testée (10, 30 et 50 ppm), la dégradation de ce dernier est amplifiée par les radiations UV. La vitesse de dégradation de l'H₂O₂ est en effet plus élevée pendant le couplage aux UV.

La figure 74 (B) représente les cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ à 30 et 50 ppm dans de l'eau brute et dans une eau supplémentée de matière organique. Dans ce cas, ces cinétiques ont été réalisées en absence et en présence des radiations UV pour la concentration de 50 ppm et uniquement en présence de radiation UV pour la concentration de 30 ppm. La composition et la concentration de cette matière organique sont identiques à celles utilisées pendant les traitements des biofilms. Comme nous l'avons déjà constaté, les radiations UV amplifient la dégradation de l'H₂O₂ et ceci quel que soit le milieu dans lequel l'expérience est réalisée (présence ou absence de matière organique). Nous constatons également que dans les mêmes conditions de radiations UV (présence ou absence de radiation), la vitesse de dégradation de l'H₂O₂ est ralentie par la présence de la matière organique dans le milieu. Le tableau 21 représente les vitesses de dégradation moyennes de l'H₂O₂ dans les différentes conditions testées.

Tableau 21 : Vitesses moyennes de dégradation de l'H₂O₂ dans les différentes conditions testées et flux d'H₂O₂ théoriques nécessaires pour le maintien des concentrations stables

Concentrations ciblée (mg/L)	UV	Matière organique 3 ppm	Vitesse de dégradation moyenne (ppm/h)	Estimation du flux d'H ₂ O ₂ (mg/h)*
10	Non	Non	0,11	11
10	Oui	Non	0,62	62
30	Non	Non	0,80	80
30	Oui	Non	2,68	268
30	Oui	Oui	2,17	217
50	Non	Non	0,5	50
50	Non	Oui	0,24	24
50	Oui	Non	2,94	294
50	Oui	Oui	1,99	199

*Ce flux correspond à la quantité injecté par heure (mg/h) dans un volume de 100 L pour le maintien des concentrations d'H₂O₂ ciblées

Aux concentrations de 30 ppm et 50 ppm, les vitesses de dégradation de l' H₂O₂ en absence de radiation UV sont de 0,8 ppm/h et 0,5 ppm/h, respectivement. En cas de couplage aux UV, ces vitesses passent à 2,68 ppm/h et 2,94 ppm/h, respectivement (tableau 21). Les mêmes tendances ont été observées en présence de matières organiques.

En l'absence de radiation UV, la vitesse de dégradation de l'H₂O₂ observée à 30 ppm (0,8 ppm/h) est plus élevée que celle observée à 50 ppm (0,5 ppm/h). La concentration initiale de l'H₂O₂ a un effet sur la vitesse de sa dégradation dans les conditions testées. Plus la concentration est élevée plus les concentrations l'H₂O₂ sont stables. Paradoxalement, en présence de radiation UV nous observons un effet inverse. La vitesse de dégradation de l'H₂O₂ observée à 30 ppm est inférieure à celle observée à 50 ppm (2,68 ppm/h et 2,94 ppm/h, respectivement).

L'ajout de 3 ppm de matière organique ralentit également la vitesse de dégradation de l'H₂O₂. A 50 ppm d'H₂O₂ sans UV cette vitesse passe de 0,5 ppm/h dans de l'eau brute à 0,24 ppm/h dans de l'eau supplémentée par la matière organique. Le même constat est observé en présence de radiations UV. Lors des essais à 30 et à 50 ppm d'H₂O₂ cette vitesse passe de 2,68 et 2,94 ppm/h dans de l'eau brute à 2,17 et 1,99 ppm/h dans de l'eau supplémentée par la matière organique, respectivement. Cette matière organique aurait donc un effet protecteur de l'H₂O₂ vis-à-vis des radiations UV. Ainsi à forte dose de matière organique l'efficacité du traitement H₂O₂/UV serait compromise du fait de la diminution de la vitesse de production des radicaux OH^{*}. Ce résultat est dû à l'effet de masque exercé par les particules de matière organique qui absorbent les radiations UV, diminuant par conséquent la catalyse de l'H₂O₂.

Bien que l'objectif de l'étude ne soit pas d'étudier les cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ dans différentes conditions, il était intéressant de faire ces essais notamment pour établir les flux nécessaires pour le maintien des concentrations d'H₂O₂ aux valeurs ciblées. Ces flux théoriques sont calculés en fonction de la vitesse de dégradation de l'H₂O₂ et du volume totale (100 L) dans lequel les expériences sont effectuées. Ces flux sont proportionnels aux concentrations ciblées et sont plus élevés en présence des radiations UV.

V.2.1.4 Flux réels d'H₂O₂ au cours des traitements PEROX (en présence de biofilms)

Afin de maintenir les concentrations de l'H₂O₂ aux valeurs ciblées, des ajouts manuels ou automatiques à l'aide d'une pompe doseuse ont été effectués. Les concentrations de l'H₂O₂ ont été contrôlées pendant les expériences et les ajouts ont été effectués en fonction de ces concentrations. Le flux de l'H₂O₂ a donc été calculé à différents temps pendant les expériences et les résultats sont présentés ci-dessous.

Le flux de l'H₂O₂ correspond à la quantité totale d'H₂O₂ injectée dans les 100 L par heure.

$$\text{Flux H}_2\text{O}_2 \text{ (mg/h)} = \frac{\text{mg H}_2\text{O}_2 \text{ injectés}}{\text{durée totale d'application (h)}}$$

V.2.1.4.1 Flux d'H₂O₂ au cours des traitements à l'H₂O₂ seul

L'évolution des concentrations et des flux de l'H₂O₂ lors des essais de traitements à l'H₂O₂ seul à 30 et à 50 ppm sont présentés dans la figure 75.

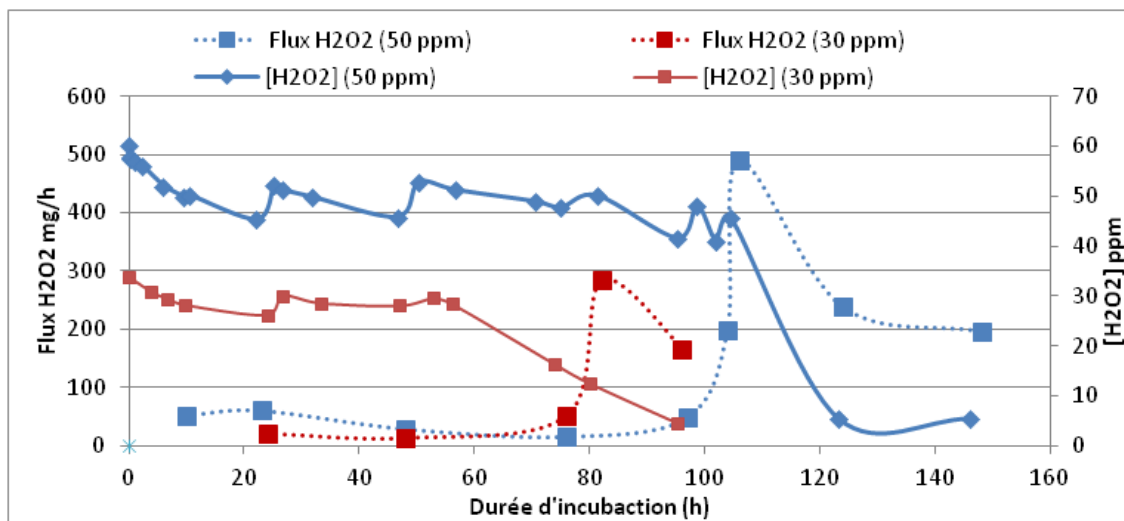


Figure 75 : Evolution des concentrations (courbes continues) et des flux de l'H₂O₂ (courbes discontinues) observés pendant les essais de traitement à l'H₂O₂ seul à des concentrations de 30 (courbes rouges) et de 50 ppm (courbes bleues).

Au cours des traitements à l'H₂O₂ seul, à 30 et à 50 ppm, on distingue deux phases d'évolution des flux de l'H₂O₂. La première phase correspond à une phase initiale où les flux d'H₂O₂ sont bas et relativement stables. Cette observation est en concordance avec les résultats des cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ seul où la vitesse de dégradation de l'H₂O₂ est faible en absence des radiations UV, d'où les flux d'H₂O₂ faibles observés. Cette phase de stabilité des flux correspond également à la phase de stabilité des concentrations d'H₂O₂ qui sont relativement maintenues aux valeurs ciblées (30 et 50 ppm). La durée de cette phase est de 3 jours à la concentration de 30 ppm d'H₂O₂ et de 4 jours à la concentration 50 ppm d'H₂O₂. On note alors que la durée de cette phase dépend de la concentration d'H₂O₂ (et de la dose initialement injectée). La deuxième phase correspond à la phase de décrochage des concentrations d'H₂O₂ et l'augmentation des flux de ce dernier. Ce sont ces chutes de concentrations qui ont mené à l'augmentation manuelle des flux afin de rétablir les concentrations ciblées. Cette augmentation est déclenchée dès 72 h (3 jours) de traitement lors de l'essai à 30 ppm d'H₂O₂ et dès 96 h (4 jours) lors de l'essai à 50 ppm d'H₂O₂.

Le niveau maximal du flux d' H_2O_2 observé est plus élevé à 50 ppm. Ces flux baissent de nouveau mais ne reviennent pas à leur niveau initial. Lors de l'essai à 30 ppm d' H_2O_2 , une seule mesure a été effectuée après le pic observé et il est impossible de conclure sur l'évolution de ce flux. Lors de l'essai à 50 ppm d' H_2O_2 , deux mesures ont été effectuées après le pic. Ce flux semble se stabiliser à un niveau supérieur au niveau initial alors que la concentration semble se stabiliser à 5 ppm.

Malgré la régulation des flux, les concentrations de l' H_2O_2 initialement ciblées n'ont donc pas pu être rétablies.

La principale constatation lors des suivis des flux d' H_2O_2 est donc l'augmentation de ces flux après une période de traitement, le déclenchement de cette augmentation est plus précoce à faible concentration d' H_2O_2 .

En absence de biofilms, les vitesses de dégradation de l' H_2O_2 observées (0,8 et 0,5 ppm/h pendant les essais à 30 et à 50 ppm d' H_2O_2 seul, respectivement) sont très faibles et n'expliquent pas les augmentations des flux observées à la fin des essais de traitement des biofilms. Les baisses de concentrations d' H_2O_2 observées lors de ces essais malgré l'augmentation des flux d' H_2O_2 supposent une surconsommation de l' H_2O_2 . Cette surconsommation qui se manifeste par l'augmentation des flux, est plus élevée lors de l'essai à 50 ppm et serait d'origine biologique.

V.2.1.4.2 Flux d' H_2O_2 au cours des traitements à l' H_2O_2 couplé aux UV

Les flux de l' H_2O_2 lors des essais de couplage des UV à 10, à 30 et à 50 ppm d' H_2O_2 , sont présentés dans la figure 76.

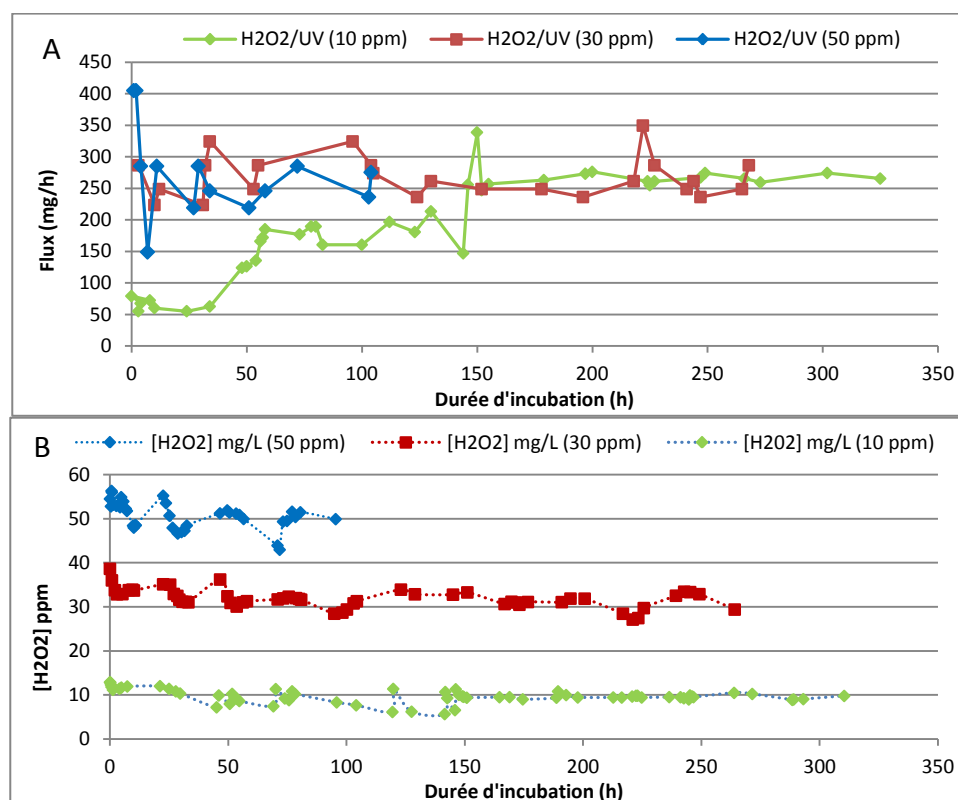


Figure 76 : Flux (A) et concentrations (B) de l' H_2O_2 observés pendant les essais de traitement à l' H_2O_2 de concentrations de 10, 30 et de 50 ppm couplé aux UV.

Au cours de ces essais, malgré les variations observées au début des traitements, les flux d' H_2O_2 se stabilisent à des valeurs proches de 250 mg/h (figure 76-A, 50 ppm : courbes bleue ; 30 ppm courbe rouge).

Lors de l'essai UV-10 ppm d' H_2O_2 , ce flux, très bas en début d'expérience, augmente de 55 mg/h à 3 h de traitement pour atteindre environ 250 mg/h à 150 h de traitement (figure 76-A, 10 ppm : courbes verte). Il se stabilise ensuite à cette valeur jusqu'à la fin de l'essai. Le flux de l' H_2O_2 , se stabilise alors à des valeurs proches de 250 ppm/h quelque soit la concentration visée, cette stabilisation s'opère tardivement (150h) lors de l'essai de 10 ppm d' H_2O_2 couplé aux UV. Bien que ces flux réels soient du même ordre de grandeur que les flux théoriques (présentés dans le tableau 21) ils semblent légèrement plus élevés. La différence entre les flux théoriques et les flux réels pourrait être attribuée à une consommation du l' H_2O_2 notamment par les biofilms.

Quelle que soit la concentration ciblée, la consommation de l' H_2O_2 par les UV (à une même puissance) est théoriquement constante. Le flux nécessaire pour le maintien de ces concentrations devrait donc être également constant. Les résultats présentés ci-dessus confirment cette constatation, puisque les flux appliqués pour le maintien des concentrations d' H_2O_2 à 10, 30 et 50 ppm sont relativement identiques et ne dépendent pas des concentrations ciblées. Ces dernières sont dépendantes principalement de l'injection initiale qui permet d'atteindre ces concentrations. Le rôle du flux d' H_2O_2 est de compenser la consommation de ce dernier par les UV et/ou par les biofilms.

En conclusion

Comme nous l'avons déjà constaté, l'application du couple H_2O_2 /UV aboutit à des vitesses de dégradation de l' H_2O_2 (en présence ou en absence des biofilms) particulièrement élevées. Le maintien des concentrations d' H_2O_2 aux valeurs ciblées nécessite donc des flux de compensation également élevés. Au cours des essais de traitements par le couple H_2O_2 /UV (à 30 et 50 ppm d' H_2O_2), les concentrations d' H_2O_2 ont pu être maintenues aux valeurs ciblées avec des flux de l'ordre de 250 mg/h et aucune surconsommation notable d' H_2O_2 n'a été observée. Ces flux sont similaires et dépendent en premier lieu de la vitesse de dégradation de l' H_2O_2 par les UV qui, pour une même dose de radiations, est théoriquement constante quelle que soit la concentration d' H_2O_2 visée.

A 10 ppm d' H_2O_2 couplé aux UV, bien que la concentration ait pu être maintenue, le flux ne se stabilise que tardivement. Nous n'avons pas effectué d'essais à 10 ppm d' H_2O_2 seul pour pouvoir comparer les flux en présence et en absence d'UV.

Lors des traitements des biofilms à l' H_2O_2 seul, ces flux sont initialement très faibles, mais suite au décrochage des concentrations de l' H_2O_2 , il a été nécessaire de les augmenter à des valeurs similaires ou supérieures à celles des flux appliqués lors des couplages. Les flux théoriques nécessaires pour compenser la dégradation naturelle de l' H_2O_2 (sans les UV et sans les biofilms) sont très faibles et n'expliquent pas l'augmentation de ces flux. Cette augmentation serait donc la conséquence d'une surconsommation de l' H_2O_2 par les communautés microbiennes apportées par les biofilms. Elle se traduit par une incapacité à maintenir les concentrations de l' H_2O_2 aux valeurs ciblées malgré l'augmentation des flux.

V.2.1.5 Effet des traitements biocides sur les communautés microbiennes du biofilms

Les essais de traitement des biofilms par le procédé Perox ont été effectués durant une période de 18 mois. Trois procédés de traitements ont été étudiés : les UV seul, l' H_2O_2 seul et le couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$. Certains essais ont été réalisés deux fois (deux expériences) et le reste ne l'a été qu'une seule fois.

Tableau 22 : Bilan des essais de traitement Perox réalisés au laboratoire

	UV	H_2O_2		$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$		
$[\text{H}_2\text{O}_2]$ ppm		30	50	10	30	50
Expérience I	X	X	X	X	X	X
Expérience II	X	X			X	

Pour les essais réalisés deux fois en deux expériences indépendantes, nous présentons les résultats des deux expériences de façon indépendante. Des moyennes entre les deux expériences sont ensuite calculées après la standardisation des résultats.

Pour rappel, le dispositif expérimental comporte deux parties, une partie consacrée à l'essai de traitement et une partie à la référence. Les deux parties comportent chacune un réservoir d'eau de 100 litres relié à un banc de 3 réacteurs biologiques. La partie « traitement » est reliée à un réacteur UV qui permet de traiter l'eau de recirculation aux UV et à une pompe doseuse qui injecte l' H_2O_2 pour maintenir les concentrations ciblées.

Les analyses ont été effectuées à raison de 3 échantillons par prélèvement (*triplicats*). Les points et les barres d'erreurs présentés sur les graphiques sont donc les moyennes et les écarts type de 3 mesures respectivement.

V.2.1.5.1 Traitements aux UV

Les essais de traitement aux UV ont été réalisés à la même dose de radiation que celle appliquée lors des traitements au couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ (60 mJ/cm^2 , 254 nm) : même caractéristiques de la lampe UV et le même débit de recirculation de l'eau dans le réacteur UV.

V.2.1.5.1.1 Analyses non spécifiques

Les évolutions des concentrations de l'ATP, des bactéries cultivables et des bactéries totales lors des traitements aux UV sont présentées dans la figure 77.

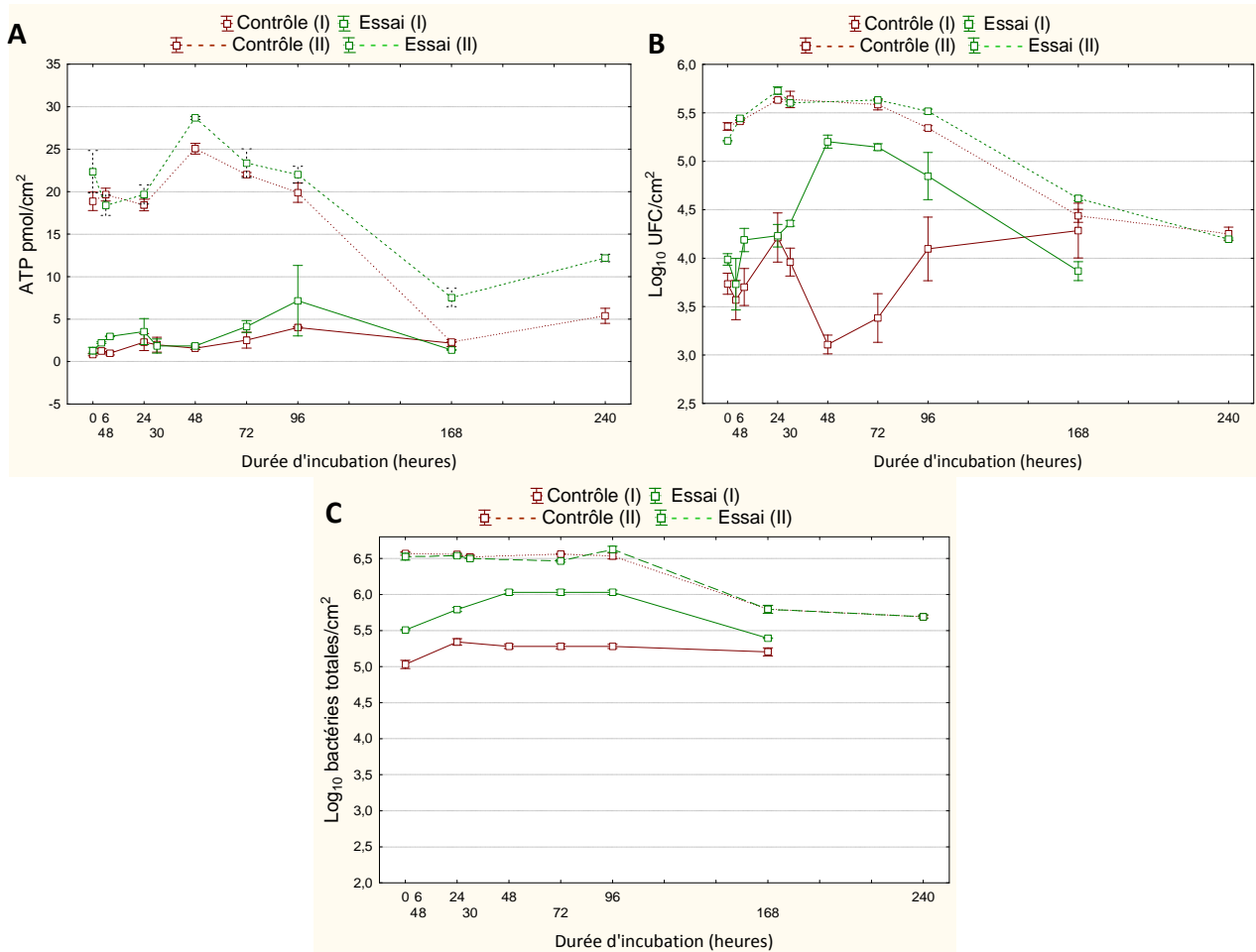


Figure 77 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm²) (A), des bactéries cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) (B), et des bactéries totales (Log₁₀ bactéries totales/cm²) (C) dans les biofilms de référence (courbes rouges) et les biofilms traités aux UV (courbes vertes). Courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II.

Les résultats des essais de traitement aux UV montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de l'ATP, des bactéries cultivables et des bactéries totales dans les biofilms traités et dans la référence non traitée. Ce résultat est démonstratif de l'absence d'un effet des radiations UV vis-à-vis des biofilms. Lors de la première expérience, on observe un effet stimulateur ponctuel des radiations UV vis-à-vis des bactéries cultivables, effet qui n'a pas été confirmé lors de la deuxième expérience.

On observe également une baisse des concentrations de ces indicateurs dès 96 h dans tous les biofilms (traités et non traités) lors de l'expérience II.

V.2.1.5.1.2 Analyses spécifiques

V.2.1.5.1.2.1 Legionella pneumophila

L'évolution des concentrations de *L. pneumophila* cultivables et totales est présentée dans la figure 78. Au cours des essais de traitements aux UV, les *L. pneumophila* cultivables ont été détectées à des concentrations très faibles dans les biofilms jusqu'à 168 h de traitement. A 240 h de traitement aucune *L. pneumophila* cultivable n'a été détectée (< 1 UFC/cm²). Aucune différence significative entre les concentrations de *L. pneumophila* cultivables (figure 78 A) dans les biofilms traités et non traités n'a été mise en évidence. Les concentrations de *L. pneumophila* totales (figure 78 B) sont sensiblement similaires dans les biofilms traités et non traités. Lors de

l'expérience II on observe une diminution de ces concentrations, constat qui a également été mis en évidence pour les autres indicateurs.

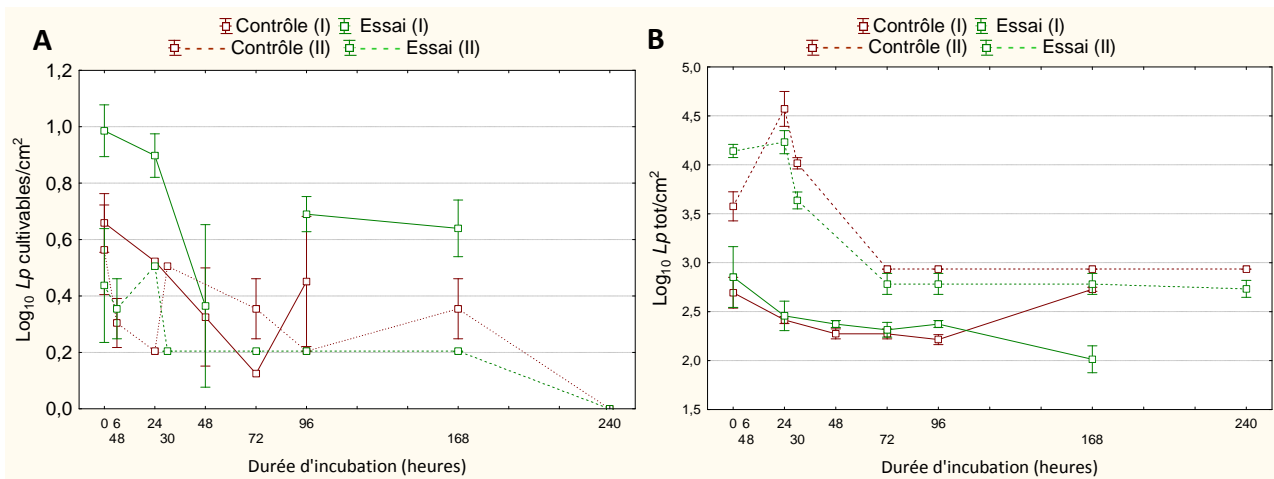


Figure 78 : Evolution des concentrations de *Lp* cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) (A) et totales (Log₁₀ N/cm²) (B) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et traités aux UV (courbes vertes). Courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II.

V.2.1.5.1.2.2 Amibes

L'évolution des concentrations des amibes sous l'effet d'un traitement UV est présentée dans la figure 79.

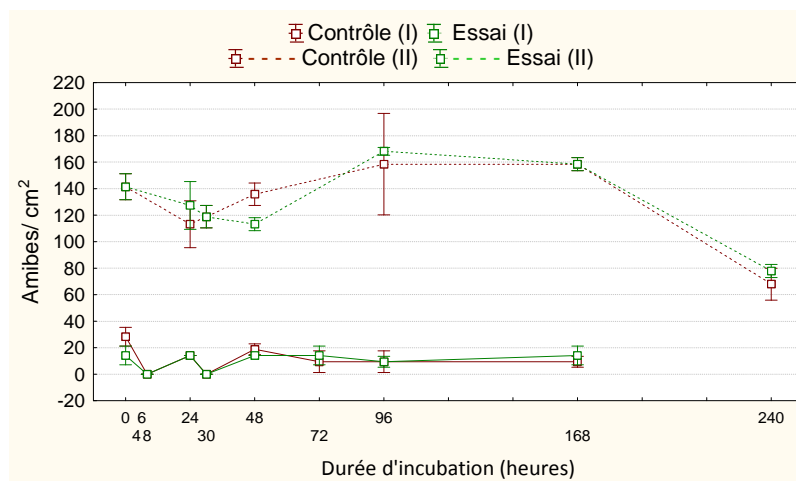


Figure 79 : Evolution des concentrations d'amibes (Amibes/cm²) dans les biofilms non traités (courbe rouge) et traités aux UV (courbe verte). Courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II.

Les concentrations des amibes dans les biofilms traités et non traités ne sont pas significativement différentes. Ces concentrations restent relativement stables jusqu'à la fin de l'expérience I, alors qu'elles baissent significativement après 168 h de traitement dans les biofilms traités et non traités lors de l'expérience II, résultats qui a également été observé pour l'ATP, les bactéries cultivables, les bactéries totales et les *L. pneumophila* totales. Cette baisse serait due à la baisse de la concentration des bactéries qui constitue le principal apport nutritif pour les amibes.

En conclusion

Le traitement aux UV seul n'a eu aucun effet sur les concentrations des indicateurs biologiques analysés dans la limite des durées d'application utilisées dans ces essais.

L'absence d'effet significatif des UV vis-à-vis des communautés microbiennes fixées est un résultat attendu et logique du fait que les biofilms ne sont pas directement exposés aux UV. Ce résultat montre également que les UV n'ont pas d'effet indirect vis-à-vis des biofilms.

V.2.1.5.2 Traitement au peroxyde d'hydrogène

Deux concentrations d' H_2O_2 , en l'occurrence 30 ppm (2 expériences) et 50 ppm, ont été appliquées pour l'étude des effets de l' H_2O_2 sur les communautés microbiennes des biofilms.

V.2.1.5.2.1 Activité métabolique

L'activité métabolique a été mesurée par ATPmétrie, l'évolution des concentrations de l'ATP (pmol d'ATP/cm²) est présentée dans la figure 80.

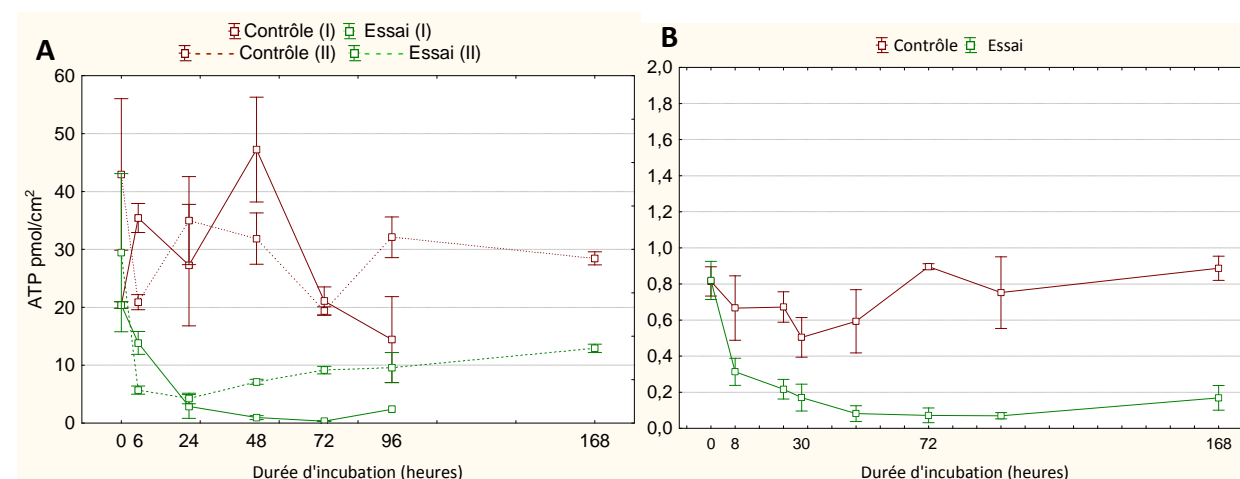


Figure 80 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes). (A) : 30 ppm d' H_2O_2 (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d' H_2O_2 .

Le traitement H_2O_2 appliqué à deux concentrations différentes, 30 ppm (figure 80 A) et 50 ppm (figure 80 B) a permis de réduire significativement les concentrations de l'ATP. En effet, dès les premières heures de traitement, les concentrations d'ATP dans les biofilms traités convergent vers des valeurs très faibles (proches de zéro). Les concentrations d'ATP dans les biofilms non traités restent relativement stables malgré quelques variations observées le long de l'expérience, probablement en relation avec les apports nutritifs effectués tous les 48 h. Les abattements des concentrations d'ATP observés sont donc dus à l'application du traitement H_2O_2 à 30 et 50 ppm. A 30 ppm d' H_2O_2 les concentrations d'ATP augmentent de nouveau après 24 h de traitement lors de l'expérience I et après 72 h de traitement lors de l'expérience II. Ces concentrations restent tout de même inférieures aux concentrations de l'ATP observées dans les biofilms non traités. A 50 ppm d' H_2O_2 ces concentrations restent très faibles et stables jusqu'à 96 h, en observe ensuite une légère augmentation de ces concentrations au dernier point de prélèvement.

V.2.1.5.2.2 Bactéries Cultivables

L'évolution des concentrations des bactéries hétérotrophes cultivables lors des traitements à l' H_2O_2 seul sont présentées dans la figure 81.

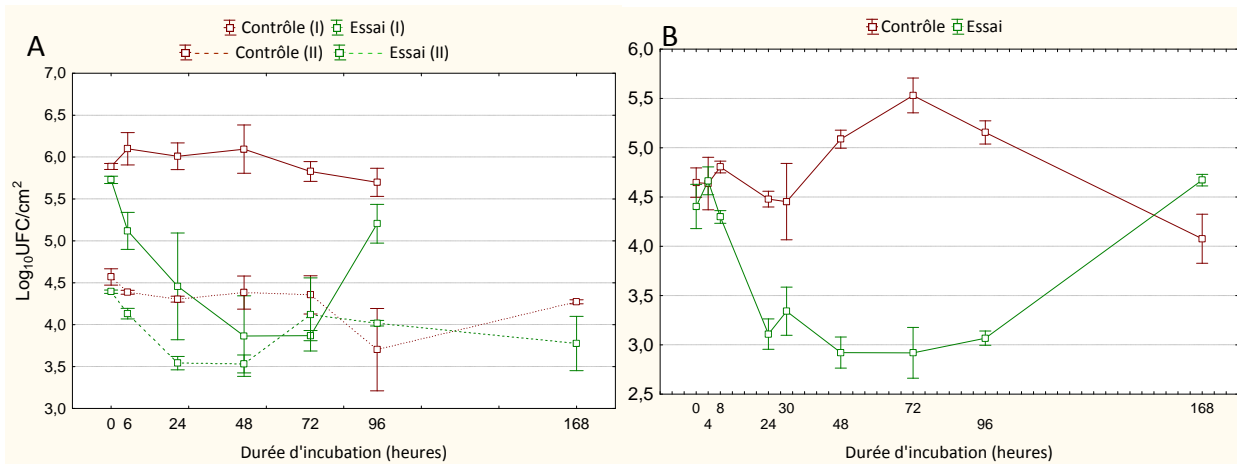


Figure 81 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables ($\text{Log}_{10} \text{UFC}/\text{cm}^2$) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes) (A) : 30 ppm d' H_2O_2 (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d' H_2O_2 .

L'application d'un traitement à l' H_2O_2 à 30 et 50 ppm permet de réduire les concentrations des bactéries cultivables durant les premières heures de traitement.

A 30 ppm d' H_2O_2 (figure 81 A), la concentration des bactéries cultivables est réduite d'un Log après 24 h de traitement. Lors de l'expérience I, cette concentration se stabilise à 3,3 Log environ jusqu'à 48 h de traitement puis augmente de nouveau pour atteindre 4,2 Log et se stabilise jusqu'à la fin de l'expérience. A partir de 72 h de traitement, la concentration des bactéries cultivables dans les biofilms traités n'est pas significativement différente de celles observées dans les biofilms non traités. Lors de l'expérience II, après l'abattement initial, ces concentrations ne semblent pas significativement différente de 24 h à 72 h. Elle augmente ensuite au dernier prélèvement pour atteindre des concentrations légèrement inférieures à celles du témoin.

A 50 ppm d' H_2O_2 (figure 81 B), la concentration des bactéries cultivables est réduite d'1,5 Log après 24 h de traitement. Cette baisse se poursuit jusqu'à 48 h où les concentrations des bactéries cultivables atteignent le niveau le plus bas qui est de 2,8 Log. Cette concentration se stabilise ensuite jusqu'à 96 h de traitement. Une augmentation de la concentration des bactéries cultivable est en effet amorcée après 96 h de traitement. Au dernier prélèvement, la concentration des bactéries cultivables dans les biofilms traités devient légèrement supérieure à celle des biofilms non traités. Les concentrations des bactéries cultivables des biofilms non traités sont relativement stables par rapport à la concentration initiale (T_0).

V.2.1.5.2.3 Bactéries totales

L'évolution des concentrations des bactéries totales lors des traitements à l' H_2O_2 seul sont présentées dans la figure 82.

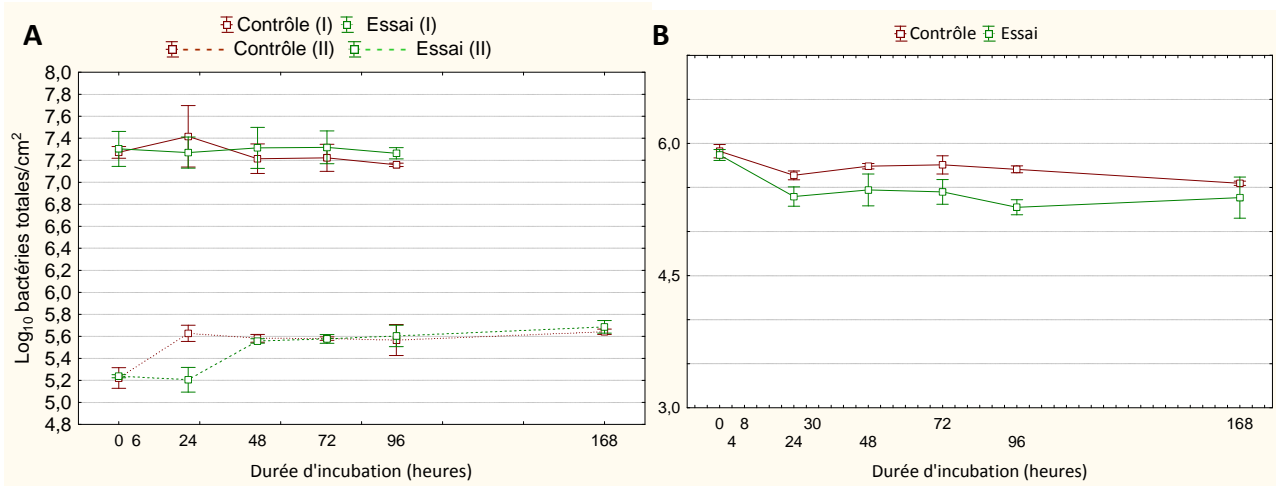


Figure 82 : Evolution des concentrations des bactéries totales ($\text{Log}_{10} \text{N}/\text{cm}^2$) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes). (A) : 30 ppm d' H_2O_2 (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d' H_2O_2 .

Les concentrations des bactéries totales dans les biofilms traités sont relativement stables tout au long des expériences. Elles ne diffèrent pas significativement des concentrations observées dans les biofilms non traités. Le traitement H_2O_2 à 30 et 50 ppm n'a eu aucun effet sur les concentrations des bactéries totales dans la limite des durées d'application du traitement.

V.2.1.5.2.4 *Legionella pneumophila*

Aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'a été détectée lors des expériences à 30 ppm d' H_2O_2 . L'évolution des concentrations de *L. pneumophila* cultivables lors du traitement à 50 ppm d' H_2O_2 est présentée dans la figure 83.

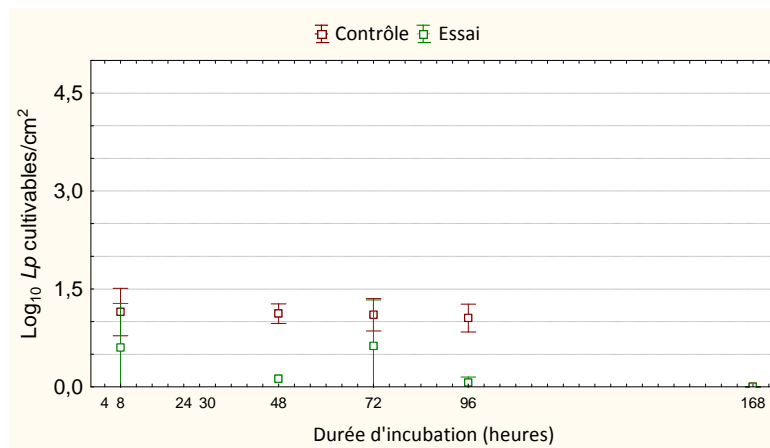


Figure 83: Evolution des concentrations des *Lp* cultivables ($\text{Log}_{10} \text{UFC}/\text{cm}^2$) dans les biofilms non traités (carrés rouges) et dans les biofilms traités (carrés verts) au cours d'un traitement à 50 ppm d' H_2O_2 .

A 50 ppm, des formes cultivables de *L. pneumophila* ont été détectées uniquement lors de certains prélèvements et à des concentrations très faibles dans les biofilms traités et non traités. Aucune conclusion ne peut donc être avancée à propos de l'effet de ce traitement sur les concentrations de *Lp* cultivables.

L'évolution des concentrations de *L. pneumophila* totales est présentée dans la figure 84.

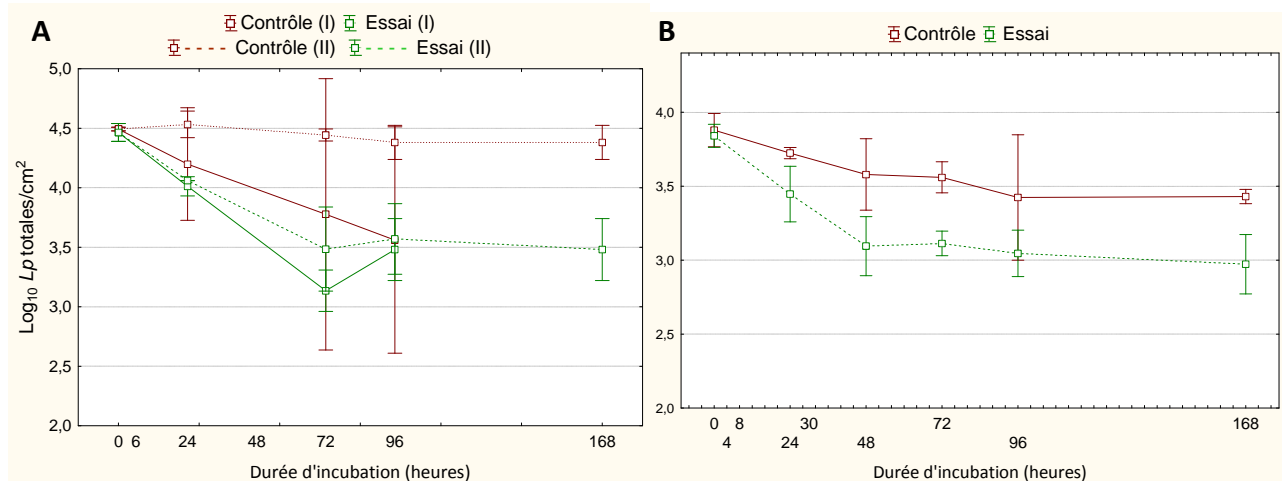


Figure 84 : Evolution des concentrations de *Lp* totales (Log₁₀ N/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes). (A) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d'H₂O₂.

A 30 ppm d'H₂O₂ (figure 84 A), on observe deux cas de figure :

- au cours de l'expérience I, ces concentrations diminuent dans les biofilms traités mais aussi dans les biofilms non traités. Globalement, les concentrations ne sont pas significativement différentes de celles des biofilms non traités.
- au cours de l'expérience II, les concentrations diminuent dès le début du traitement et se stabilisent dès 72 h à 3,5 Log environ. A 30 ppm d'H₂O₂ le traitement abaisse la concentration en *L. pneumophila* totales d'1 Log après 72 h de traitement.

A 50 ppm d'H₂O₂ (figure 84 B), les concentrations des *L. pneumophila* totales diminuent dans les biofilms traités dès le déclenchement du traitement également, elles se stabilisent ensuite dès 48 h à 3,5 Log environ et ce, jusqu'à la fin de l'expérience. A 50 ppm d'H₂O₂ le traitement abaisse la concentration en *L. pneumophila* totales d'1 Log après 48 h de traitement.

L'application de l'H₂O₂ aboutit donc à un abattement d'environ 1 Log quelle que soit la concentration d'H₂O₂ appliquée. Cependant, cet abattement est acquis à 72 h à 30 ppm d'H₂O₂ (lors de l'expérience II) et uniquement à 48 h à 50 ppm d'H₂O₂.

V.2.1.5.2.5 Amibes

L'évolution des concentrations des amibes dans les biofilms au cours des traitements à 30 et 50 ppm d'H₂O₂ sont présentées dans la figure 85. Quelle que soit la concentration d'H₂O₂ appliquée, les concentrations des amibes dans les biofilms traités ne sont pas significativement différentes de celles des biofilms non traités. Les valeurs sont en effet associées à des incertitudes élevées. Ces incertitudes ne permettent pas de dissocier les courbes d'évolution des concentrations des amibes dans les biofilms de référence et dans les biofilms traités. Aucun effet de l'H₂O₂ sur les concentrations des amibes n'a donc été observé pendant la durée de l'expérimentation.

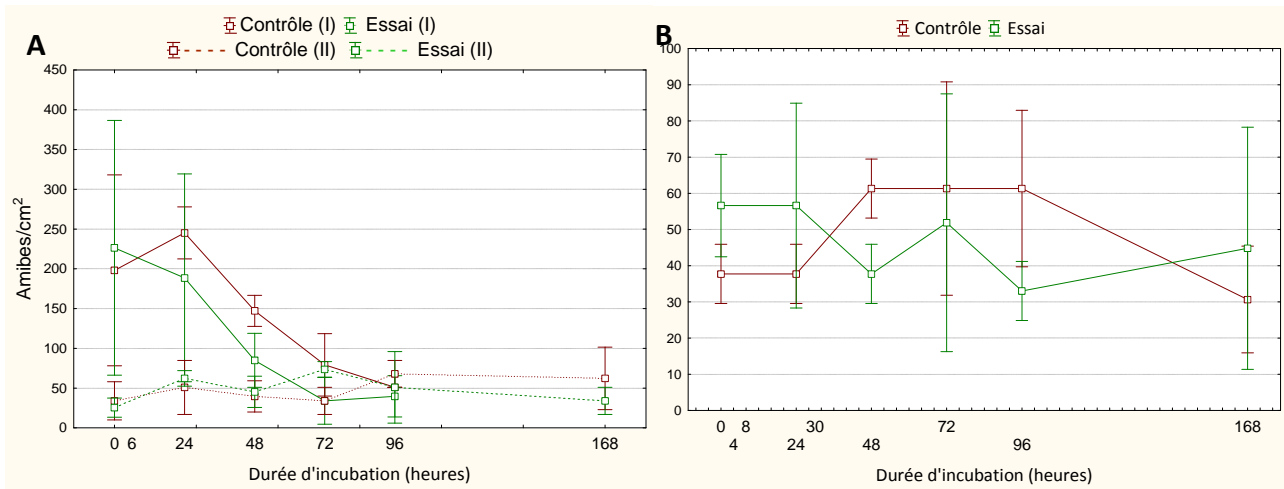


Figure 85 : Evolution des concentrations des amibes (amibes/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes). (A) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d'H₂O₂.

En conclusion

Le traitement à l'H₂O₂ appliqué isolément a permis de réduire significativement les concentrations de l'ATP et des bactéries cultivables durant la première phase de traitement. Néanmoins ces concentrations augmentent de nouveau à partir de 48 h à 30 ppm et à partir de 72 h à 50 ppm d'H₂O₂. Même à 50 ppm, il n'a pas été observé de réduction drastique des concentrations des bactéries totales et des *L. pneumophila* totales. Ce traitement ne semble pas avoir d'effet sur les concentrations d'amibes.

L'augmentation des concentrations des bactéries cultivables et de l'ATP (dans une moindre mesure) dans une deuxième phase au cours des traitements à l'H₂O₂ est assimilée à une reviviscence et coïncide avec l'augmentation des flux et la surconsommation d'H₂O₂ observées lors de ces traitements.

V.2.1.5.3 Le traitement H₂O₂/UV

Le traitement H₂O₂/UV a été appliqué à 3 concentrations d'H₂O₂ : 10, 30 et 50 ppm et à une seule puissance UV (60 j/cm², 254 nm). Seule la concentration de 30 ppm a été testée au cours de deux expériences. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

V.2.1.5.3.1 Activité métabolique

L'application du couple H₂O₂/UV à 10 ppm d'H₂O₂ aboutit à un abattement transitoire des concentrations d'ATP dès 6 h de traitement (figure 86 A). La concentration de l'ATP dans les biofilms traités est significativement inférieure à celle des biofilms non traités. Néanmoins, cette concentration augmente de nouveau dans les biofilms traités pour atteindre des concentrations similaires à celles observées dans les biofilms non traités. A la fin de l'essai, on observe de nouveau une diminution des concentrations d'ATP à partir de 192 h de traitement dans les biofilms traités ou non traités. On ne peut donc pas attribuer cette diminution à l'effet de ce traitement.

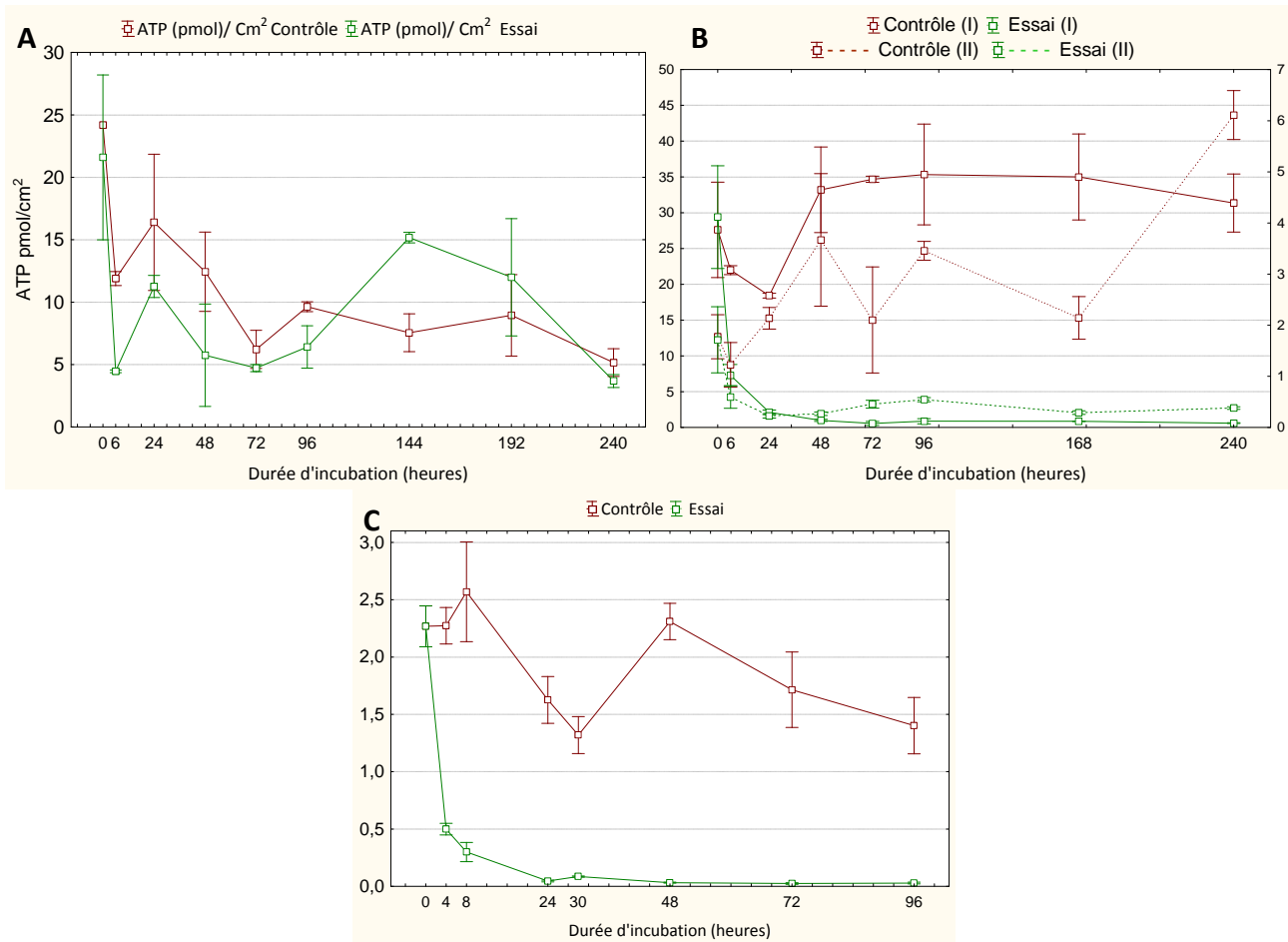


Figure 86 : Evolution des concentrations d'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités par le couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; ordonnées à gauche, courbes discontinues : expérience II, ordonnées à droite) et (C) 50 ppm d'H₂O₂.

L'application de ce procédé à 30 ppm (figure 86 B) et à 50 ppm (figure 86 C) permet un abattement significatif des concentrations de l'ATP dès 6 h et 4 h de traitement, respectivement. Les concentrations de l'ATP atteignent des valeurs très faibles. Notons ici que l'activité métabolique des biofilms durant la 2^{ème} expérience à 30 ppm et à 50 ppm a été considérablement plus faible que celle enregistrée lors des deux essais précédents.

Contrairement à ce qui a été observé lors des traitements à l'H₂O₂ seul et aux mêmes concentrations, aucune augmentation des concentrations d'ATP n'a été observée lors des traitements par le couplage H₂O₂/UV (30 et 50 ppm).

V.2.1.5.3.2 Bactéries cultivables

L'application du couple H₂O₂/UV à 10 ppm d'H₂O₂ (figure 87 A) n'a aucun effet sur les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms traités. Ces concentrations ne varient pas au cours de cet essai et ne sont pas significativement différentes de celles observées dans les biofilms non traités.

A 30 ppm (figure 87 B) et à 50 ppm (figure 87 C) d'H₂O₂, le couplage aboutit à un abattement significatif des concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms traités. Les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms non traités restent stables au cours de ces essais. Cet abattement est donc attribué à l'effet du traitement. A la fin des essais, ces couplages aboutissent à des réductions de 3 et 4,5 Log de bactéries cultivables à 30 et 50 ppm d'H₂O₂, respectivement.

Aucune augmentation significative des concentrations bactériennes n'a été observée durant la deuxième phase des essais.

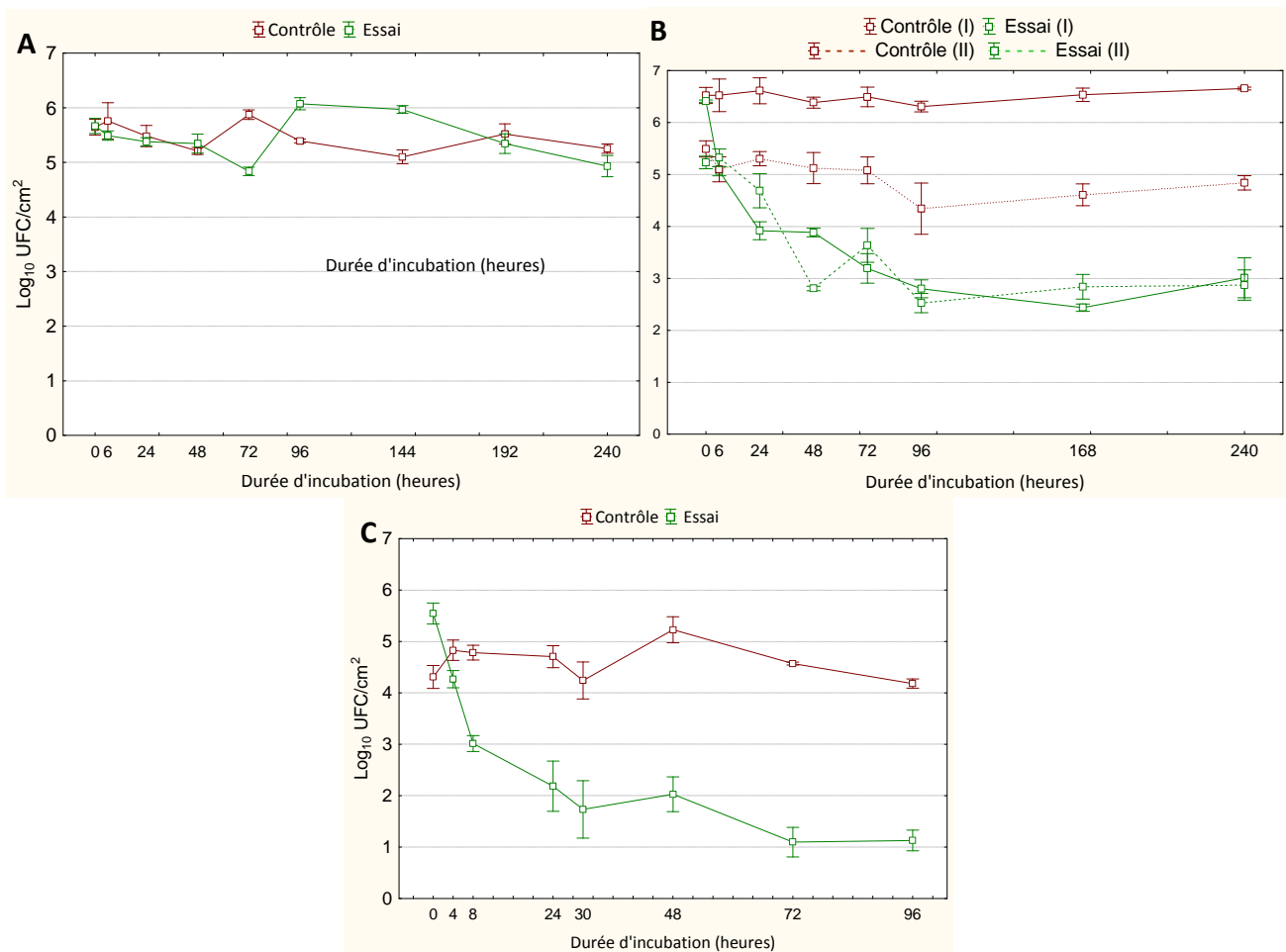


Figure 87 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités au couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ (courbes vertes). (A) : 10 ppm d' H_2O_2 , (B) : 30 ppm d' H_2O_2 (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d' H_2O_2 .

V.2.1.5.3.3 Bactéries totales

A 10 ppm d' H_2O_2 couplé aux UV (figure 88 A) la concentration des bactéries totales dans les biofilms traités ne varie pas. A 30 (figure 88 B) et à 50 ppm (figure 88 C) d' H_2O_2 couplé aux UV l'évolution des concentrations des bactéries totales comporte deux phases :

- une première phase au cours de laquelle ces concentrations sont stables et non significativement différentes de celles des biofilms non traités.
- une seconde phase au cours de laquelle ces concentrations baissent et deviennent significativement inférieures à celles des biofilms non traités. Cette diminution d' 1 Log est néanmoins acquise à des durées de traitement différentes : à 96 h à 30 ppm d' H_2O_2 et à 72 h à 50 ppm d' H_2O_2 .

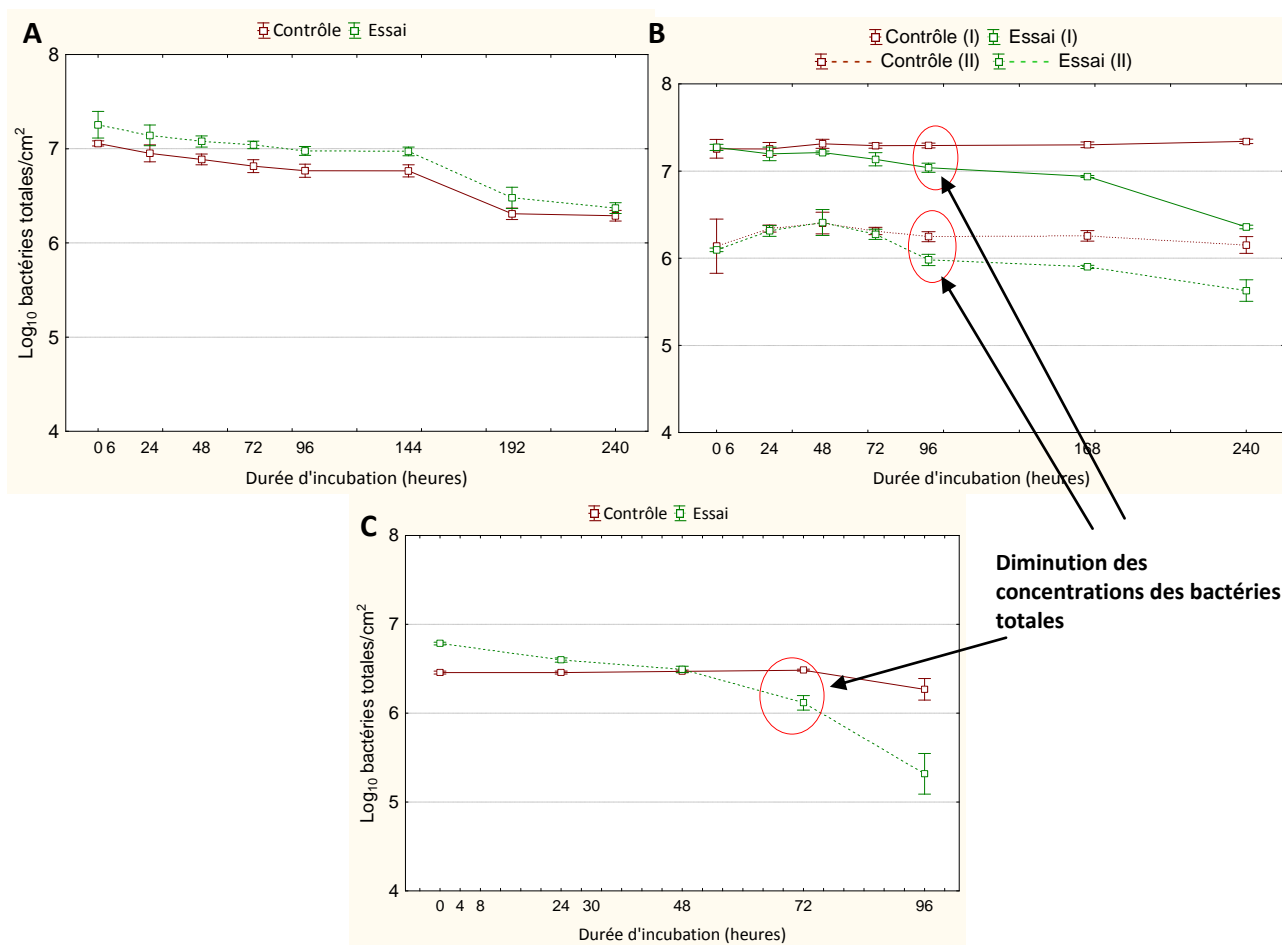


Figure 88 : Evolution des concentrations des bactéries totales ($\text{Log}_{10} \text{N}/\text{cm}^2$) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités par le couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ (courbes vertes). (A) : 10 ppm d' H_2O_2 , (B) : 30 ppm d' H_2O_2 (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d' H_2O_2 .

V.2.1.5.3.4 *Legionella pneumophila*

L'évolution des concentrations des *L. pneumophila* cultivables au cours des traitements à l' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ est présentée dans la figure 89.

La détection de *L. pneumophila* cultivable n'a pas été possible pour tous les prélèvements. En effet, la concentration de cette bactérie dans les biofilms est très faible et inférieure à 1 Log/cm^2 . Lors de l'essai de traitement à 10 ppm d' H_2O_2 (couplé aux UV), les *L. pneumophila* cultivables ont été indétectables après le point 6 h dans les biofilms traités et non traités. Leurs concentrations à T0 et à 6 h sont très faibles (inférieur à 0,5 Log) et ne permettent pas de mettre en évidence l'effet de ce traitement vis à vis des formes cultivables de *L. pneumophila* dans les biofilms. Lors de l'essai à 30 ppm d' H_2O_2 (figure 89 B), les *L. pneumophila* cultivables sont détectées jusqu'à 168 h (240 h pour la référence de l'expérience II, courbe rouge discontinue). Les valeurs sont néanmoins associées à de fortes incertitudes et aucune conclusion ne peut être faite sur l'efficacité de ce traitement vis-à-vis de *L. pneumophila* cultivables.

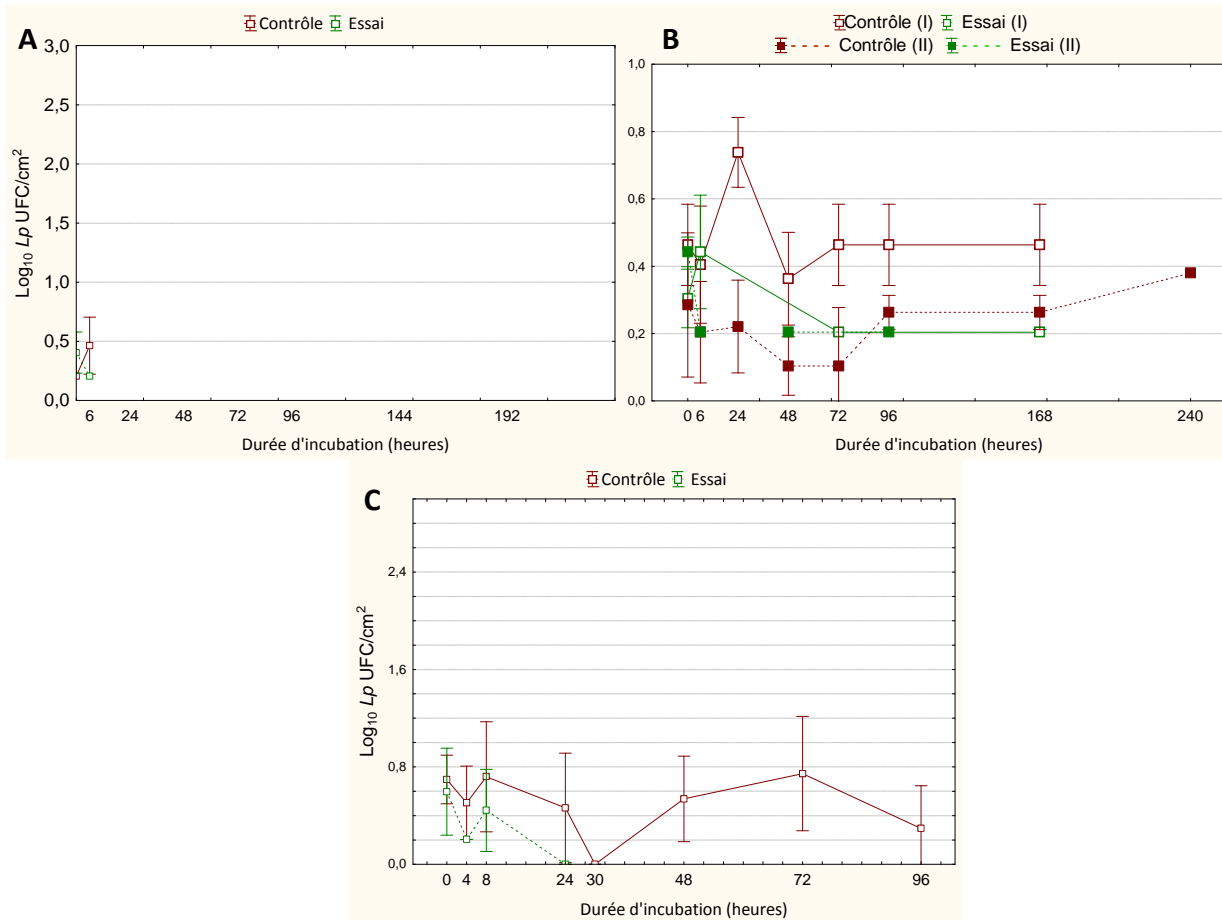


Figure 89 : Evolution des concentrations des *L. pneumophila* cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités au couple H₂O₂/UV (courbes verts). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d'H₂O₂.

A 50 ppm d'H₂O₂, (figure 89 C) la concentration des *Lp* cultivables dans les biofilms non traités a été stable durant l'expérience (inférieure à 1 Log/cm²). Dans les biofilms traités, la concentration des *L. pneumophila* cultivables baisse jusqu'à devenir indétectable dès 24 h de traitement. Au cours de cet essai (50 ppm/UV), les concentrations des *L. pneumophila* cultivables dans les biofilms traités sont inférieures à celles observées dans les biofilms non traités. Néanmoins leurs faibles concentrations et leur instabilité ne permettent pas de conclure pour l'instant, sur un éventuel effet du traitement.

L'évolution des concentrations des *L. pneumophila* totales au cours des traitements à l'H₂O₂/UV est présentée dans la figure 90.

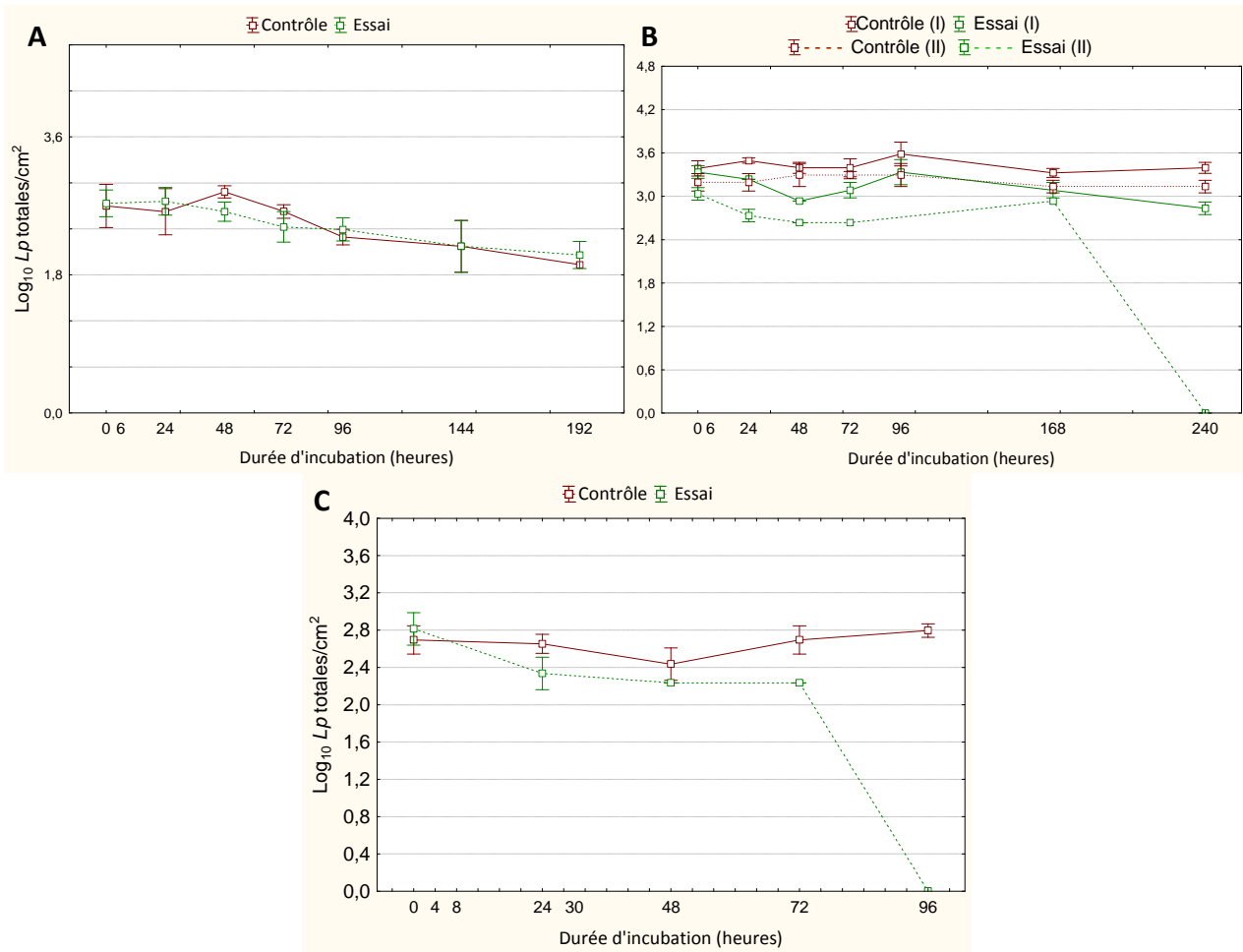


Figure 90 : Evolution des concentrations des *L. pneumophila* totales (Log₁₀ Lp/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités au couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d'H₂O₂.

Lors du traitement des biofilms à 10 ppm d'H₂O₂ (figure 90 A), les concentrations des *L. pneumophila* totales dans les biofilms traités et non traités sont similaires tout au long de l'expérimentation. A 30 ppm d'H₂O₂ couplé aux UV (figure 90 B), au cours de l'expérience I, cette concentration baisse légèrement puis se stabilise dès 48 h dans les biofilms traités. Ces concentrations restent inférieures à celle des biofilms non traités, la différence semble néanmoins non significative. Lors de l'expérience II (à 30 ppm), on observe la même tendance mais la différence entre les biofilms traités et non traités est plus marquée que celle de l'expérience I. De plus, les légionelles (totales) deviennent indétectables dans les biofilms traité après 168 h.

On observe la même tendance lors du traitement à 50 ppm d'H₂O₂ couplé aux UV (figure 90 C), les *L. pneumophila* totales deviennent indétectables dans les biofilms traités après 72 h (donc chute de 3 Log) alors qu'elle reste relativement stable dans les biofilms non traités.

V.2.1.5.3.5 Amibes

Les concentrations des amibes dans les biofilms traités à l'H₂O₂ à 10 ppm couplé aux UV sont similaires à celles observées dans les biofilms non traités (figure 91 A). Ces concentrations oscillent pendant cet essai mais aucune différence significative entre les concentrations dans les biofilms traités et non traités n'a été observée. Lors du traitement à l'H₂O₂ à 30 ppm et 50 ppm couplé aux UV (figure 91 B et C), la concentration des amibes dans les biofilms traités diminue dès 24 h et ces concentrations deviennent significativement inférieures à celles observées dans les biofilms non

traités d'un facteur 3 lors de la 1^{ère} expérience à 30 ppm et à 50 ppm d'H₂O₂. Cet écart semble moins important lors de la 2^{ème} expérience à 30 ppm d'H₂O₂. Les amibes ont été détectées dans tous les prélèvements lors des 3 essais effectués (2 expériences à 30 ppm d'H₂O₂). La baisse des concentrations des amibes lors de l'essai à 30 et à 50 ppm d'H₂O₂ couplé aux UV pourrait donc être attribuée à l'effet direct ou indirect du traitement. L'effet indirect résulte de la diminution des concentrations des bactéries qui constituent le principal apport nutritif des amibes.

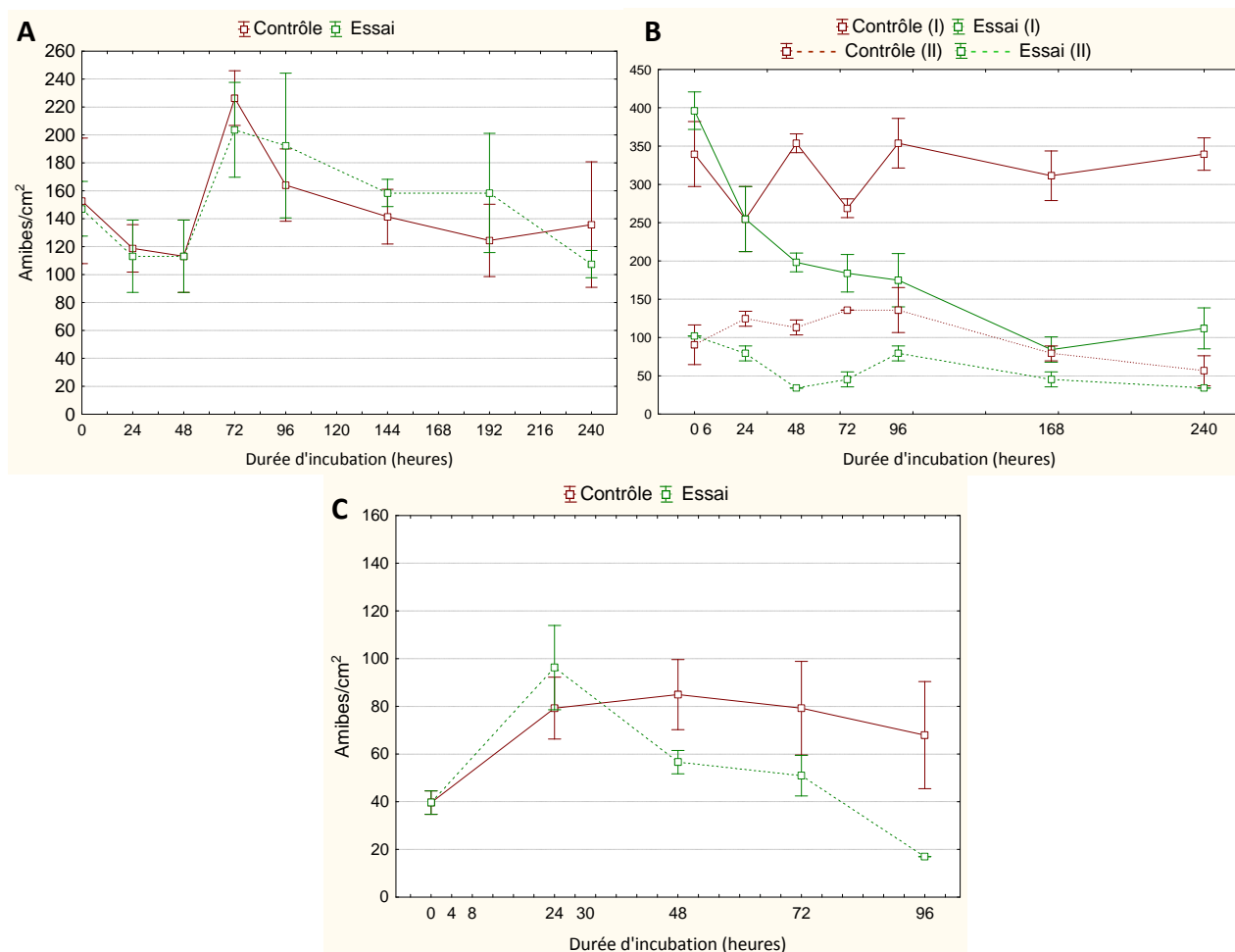


Figure 91 : Evolution des concentrations des amibes (Amibes/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités au couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d'H₂O₂.

En conclusion

Ces résultats permettent de déduire que le couplage des UV à 10 ppm d'H₂O₂, n'a aucun effet significatif sur les concentrations des indicateurs biologiques analysés. L'augmentation des concentrations d'H₂O₂ à 30 et 50 ppm a permis de réduire significativement les concentrations de la majorité des indicateurs analysés, en l'occurrence l'ATP, les bactéries cultivables et totales, et les Lp totales. Les concentrations des amibes ont significativement diminué sous l'effet du couple H₂O₂/UV, à la concentration de 50 ppm d'H₂O₂ et le même traitement lors de la 1^{ère} expérience à la concentration de 30 ppm d'H₂O₂. Les faibles concentrations de Lp cultivables (parfois indétectables) ne nous permettent pas de conclure sur l'effet de ces traitements vis-à-vis des formes cultivables de cette bactérie dans les biofilms. Néanmoins il est important de signaler que ses concentrations dans les biofilms traités par le couple UV-50 ppm d'H₂O₂ semblent plus faibles que celles observées dans les biofilms non traités.

De façon attendue, les deux indicateurs liés à l'activité métabolique des biofilms, en l'occurrence, l'ATP et les bactéries cultivables, se sont révélés les plus sensibles au traitement. Les résultats montrent cependant que cette sensibilité peut poser problème sur le plan des protocoles expérimentaux. En effet, cette diminution témoigne dans certains cas de la dégradation des conditions d'incubation des biofilms.

La sensibilité au traitement des bactéries totales est par contre plus faible. Un temps d'application plus long est nécessaire pour obtenir un abattement significatif de cet indicateur. Ce temps est proportionnel à la concentration de l'H₂O₂. Ce constat est très probablement lié à la technique de dénombrement qui ne différencie pas les cellules vivantes et mortes. Il indique aussi qu'un temps d'exposition relativement long est nécessaire, aux concentrations utilisées, pour que l'intégrité des bactéries soit touchée. La concentration de 10 ppm s'est avéré complètement inefficace alors que pour les concentrations de 30 et 50 ppm, 96 h et 72 h d'application ont été nécessaires pour diminuer significativement les concentrations des bactéries totales, respectivement.

Ce traitement s'est également avéré efficace vis-à-vis des amibes aux concentrations de 30 et 50 ppm d'H₂O₂. La baisse des concentrations d'amibes pourrait être attribuée à l'effet biocide direct du traitement et/ou à un effet trophique lié à l'abaissement des concentrations de bactéries (également sous l'effet du traitement) qui constituent l'apport nutritif principal des amibes.

V.2.1.6 Effet des traitements biocides H₂O₂, UV et H₂O₂/UV sur la charge microbiologiques de l'eau de recirculation

Bien que l'objectif de ce projet soit principalement l'étude de l'effet des biocides sur les communautés microbiennes fixées, des analyses ont été effectués afin d'évaluer l'effet de ces traitements sur les microorganismes en suspension. Ces analyses concernent uniquement l'ATP, les bactéries cultivables et les bactéries totales. Les résultats de ces analyses sont présentés en comparaison avec les résultats de l'analyse des biofilms correspondants.

V.2.1.6.1 Traitement UV

Les évolutions des concentrations d'ATP, des bactéries cultivables et des bactéries totales dans les biofilms et dans l'eau circulante au cours d'un traitement aux UV sont présentées dans la figure 92.

Ces résultats montrent que les concentrations initiales (T0) des 3 indicateurs analysés dans le circuit traité sont inférieures à celle observées dans le circuit de référence. Les concentrations de l'ATP (figure 92 A) ne varient pas au cours du traitement aussi bien dans l'eau que dans les biofilms. Ce traitement n'a donc aucun effet sur les concentrations de l'ATP dans l'eau et dans les biofilms.

L'évolution des concentrations des bactéries cultivables présentée dans la figure 92-B montre qu'elles diminuent légèrement dans un premier temps dans l'eau traitée. Ces concentrations augmentent ensuite pour atteindre le niveau initial observé à T0. Ces résultats montrent donc que le traitement n'a eu qu'un effet transitoire durant les premières heures de traitement. Cette cinétique d'évolution est donc différente de celle observée dans les biofilms pour lesquels aucun effet du traitement, même transitoire, n'a été observé. Les concentrations des bactéries cultivables en suspension augmentent dans le circuit traité après l'effet transitoire alors qu'elles diminuent dans le circuit de référence. Ce constat pourrait être rapproché d'un éventuel effet stimulateur des UV par la dégradation de formes complexes de la matière organique.

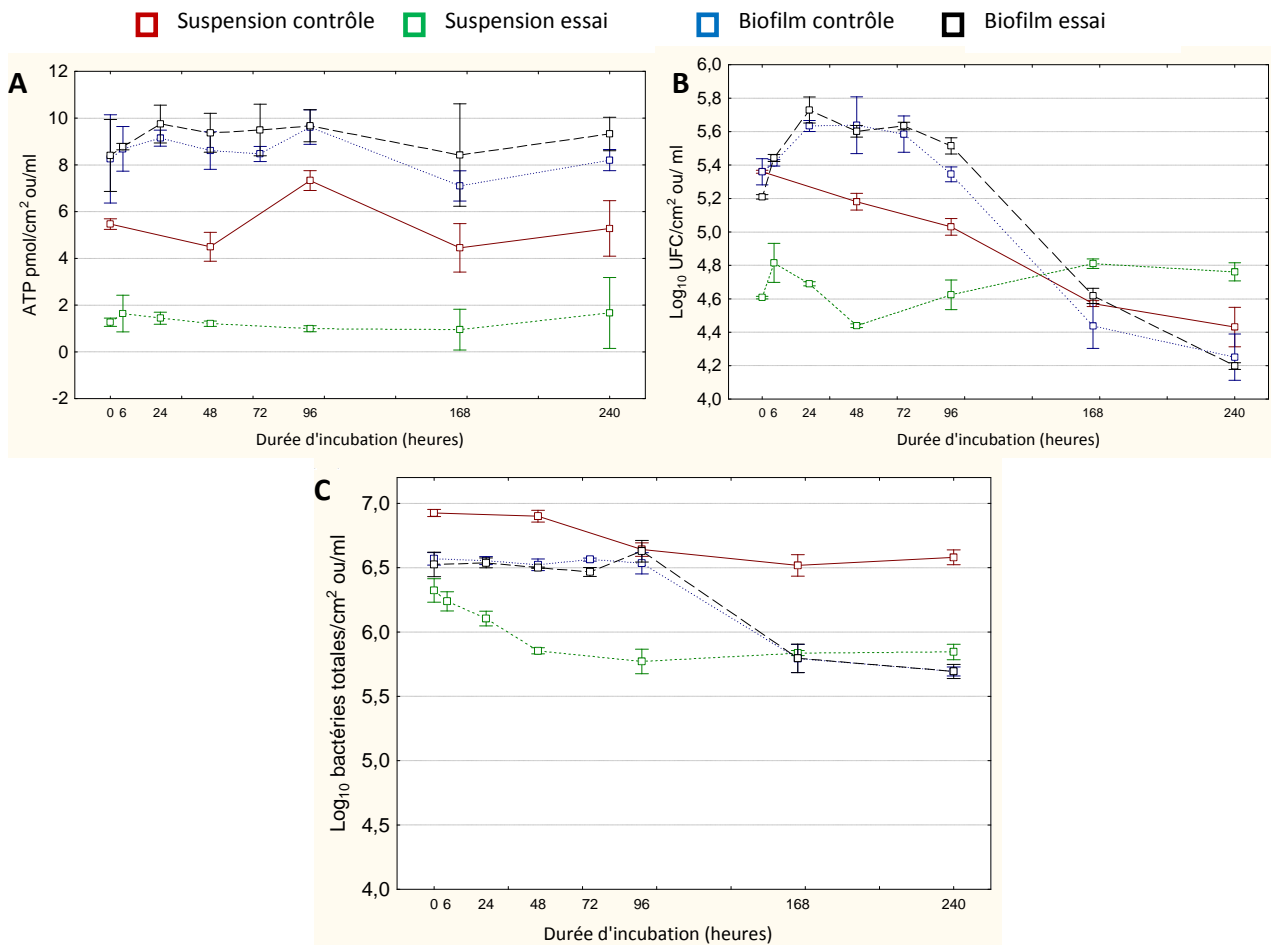


Figure 92 : Evolution des concentrations de l'ATP (A), des bactéries cultivables (B) et des bactéries totales (C) dans le biofilms (pmol/cm²) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau (pmol/ml) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) au cours d'un traitement aux UV

La figure 92-C montre que les concentrations des bactéries totales dans l'eau traitée diminuent également dès les premières heures de traitement. Ces concentrations se stabilisent à partir de 48 h de traitement jusqu'à la fin de l'essai à une concentration inférieure à la concentration initiale. Ce traitement a également un effet transitoire sur les concentrations des bactéries totales en suspension mais aucun effet sur les concentrations des bactéries totales des biofilms.

Les concentrations à T0 de ces 3 indicateurs observées dans l'eau de recirculation traitée sont inférieures à celle observées dans l'eau de recirculation non traitées. Considérant cet écart initial (T0) nous ne pouvons pas attribuer ces différences à l'effet du traitement. Cependant, la comparaison des concentrations des trois indicateurs de l'eau dans le circuit traité, à T0 et après l'application du traitement montre que ce dernier aurait un effet transitoire vis-à-vis de l'ATP et des bactéries (cultivables et totales) en suspension.

Le traitement aux ultraviolets est un procédé de désinfection largement utilisé, connu pour ses performances. Les microorganismes en suspension sont directement exposés aux radiations UV. Les résultats de notre étude montrent une performance très faible (avec un effet transitoire vis-à-vis des bactéries) malgré une dose d'UV très élevée appliquée pendant 240 h. L'absence d'efficacité de ce traitement vis-à-vis des biofilms est logique du fait que ces derniers ne sont pas directement exposés aux UV. La faible performance des UV vis-à-vis des microorganismes planctoniques est contradictoire avec les données bibliographiques notamment dans le cas du traitement de l'eau potable. Ce résultat s'explique par la présence de matière organique sous forme de particule

insolubles apportées par les acides humiques qui joue ainsi un rôle de masque en absorbant les radiation UV et protège par conséquent les microorganismes de l'action des UV. Ce résultat rejoint le résultat concernant la vitesse de dégradation de l' H_2O_2 sous l'effet des UV. Il montre en effet que la catalyse de l' H_2O_2 est plus faible en présence de matière organique confirmant l'effet de masque de cette dernière vis-à-vis des radiations UV. De plus les biofilms qui ne sont pas affectés par l'action des UV jouent un rôle dans le renouvellement des microorganismes de la phase aqueuse. Les UV n'ont pas d'effet rémanent en cas d'arrêt des traitements, ce qui favorise la reviviscence.

En conclusion

Dans les conditions de nos essais, l'évolution des concentrations des indicateurs analysés dans le biofilms et dans l'eau circulante ne suivent pas la même cinétique sous l'effet des radiations UV. Ce traitement a, dans un premier temps, un effet transitoire vis-à-vis de la charge microbologique de l'eau, puis un effet stimulateur, alors qu'il n'a aucun effet sur la charge microbienne globale des biofilms.

Bien que les UV soient connus en tant que procédé efficace de traitement, il s'avère que ce traitement n'est pas adapté à l'application étudiée, notamment en relation avec la charge organique de l'eau et avec la présence des biofilms qui joue en sa défaveur.

V.2.1.6.2 Traitement au peroxyde d'hydrogène

L'analyse de l'effet de l' H_2O_2 sur les microorganismes en suspension a été effectuée uniquement lors d'un essai à 30 ppm. Les résultats sont présentés dans la figure 93.

L'application de l' H_2O_2 à une concentration de 30 ppm permet de réduire les concentrations de l'ATP (figure 93 A) et des bactéries cultivables (figure 93 B) en suspension mais n'a aucun effet sur les concentrations des bactéries totales. La concentration de l'ATP baisse significativement (de 4 à 0,5 pmol/cm²) après 9 h de traitement. Cette concentration se stabilise ensuite jusqu'à 48 h tandis que la concentration de l'ATP dans l'eau non traitée ne varie pas jusqu'à 48 h. A partir de 48 h de traitement, on observe une augmentation des concentrations de l'ATP dans l'eau traitée et non traitée, nous ne pouvons donc pas attribuer cette augmentation à l'effet du traitement.

La comparaison des cinétiques d'évolution des concentrations de l'ATP dans l'eau traitée et dans les biofilms traités (préalablement décrites) montre que durant les premières heures de traitement ces évolutions suivent une même cinétique (une baisse de ces concentrations). A la fin de cet essai, cette concentration augmente dans les biofilms traités et dans l'eau traitée. Cette augmentation est assimilée à une reviviscence mais dans le cas des concentrations d'ATP dans l'eau cette reviviscence a également été observée dans le circuit non traité.

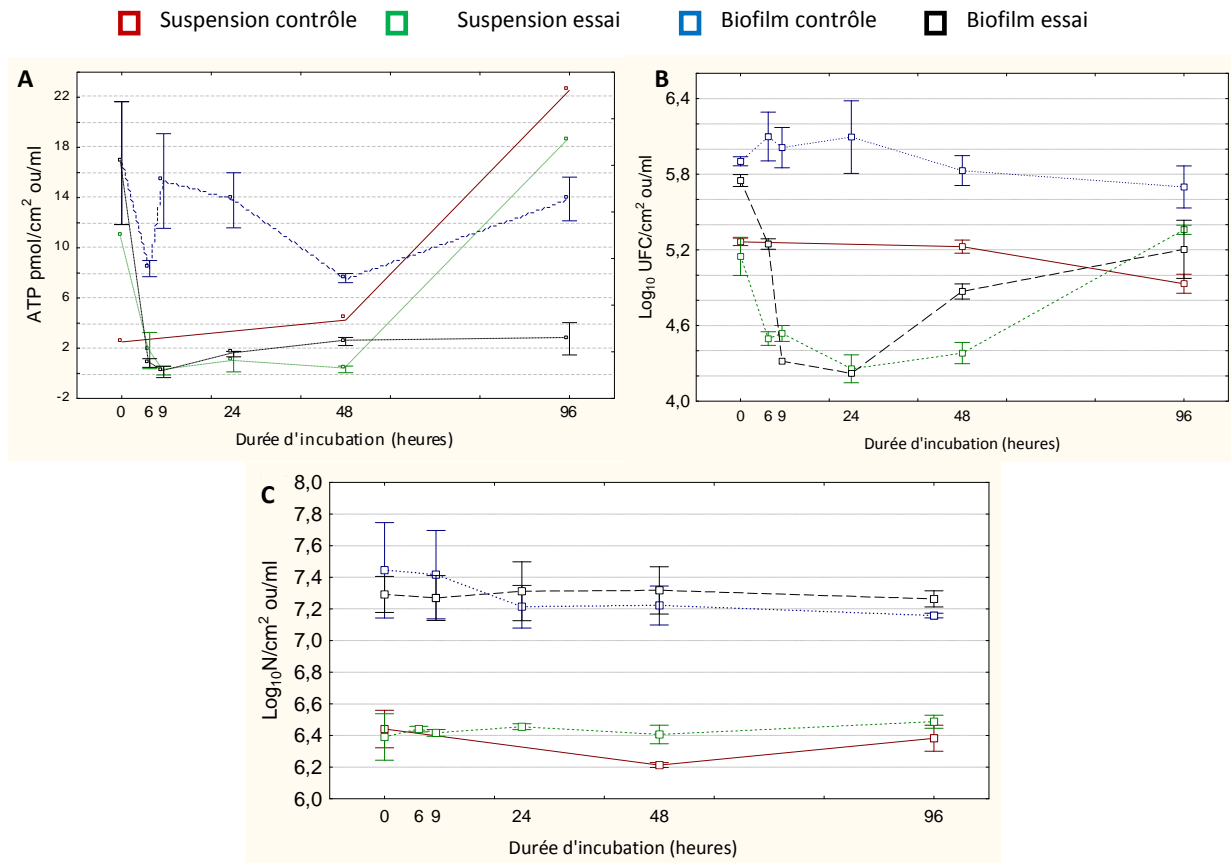


Figure 93: Evolution des concentrations de l'ATP (A), des bactéries cultivables (B) et des bactéries totales (C) dans le biofilm (/cm²) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau (/ml) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) sous l'effet d'un traitement à l'H₂O₂ à 30 ppm.

La concentration des bactéries cultivables diminue également dans l'eau traitée. Elle passe en effet de 5,2 Log à 4 Log/cm² après 24 h de traitement. Cette concentration se stabilise ensuite jusqu'à 48 h seuil au-delà duquel elle augmente pour atteindre une concentration de 5,5 Log/cm². La concentration des bactéries cultivables dans l'eau non traitée ne varie pas significativement durant l'expérience. Cette cinétique d'évolution est similaire à celle observée dans les biofilms traités. En effet, la reviviscence des bactéries cultivables observée dans l'eau a également été observée dans les biofilms traités. Par ailleurs, les concentrations des bactéries totales dans l'eau traitée ne subissent aucune variation et ne sont pas significativement différentes de celles de l'eau non traitée. Le même constat peut être fait dans les biofilms traités. L'augmentation des concentrations des bactéries cultivables et de l'ATP dans la phase aqueuse pourrait s'expliquer également par un décrochage des biofilms sous l'effet de l'H₂O₂ notamment durant la première phase de traitement durant laquelle nous avons observé une efficacité du traitement vis-à-vis des biofilms. L'hypothèse d'une reviviscence reste tout de même l'hypothèse la plus logique dans ce cas.

En conclusion

Les concentrations d'ATP, des bactéries cultivables et des bactéries totales suivent globalement la même cinétique d'évolution dans les biofilms et dans l'eau circulante sous l'effet de l'H₂O₂ à 30 ppm. On observe en effet un abattement transitoire des concentrations de l'ATP et des bactéries cultivables puis ces concentrations augmentent de nouveaux en fin de traitement pour revenir à un taux proche de la valeur initiale. Cette reviviscence est observée dans les biofilms et

dans l'eau de recirculation traitée. Ce traitement n'a donc aucun effet à long terme sur les concentrations des bactéries totales dans les biofilms et dans l'eau.

Le traitement à l' H_2O_2 seul aux concentrations testées ne semble pas suffire pour une efficacité optimale sur les microorganismes en suspension et sur les biofilms.

V.2.1.6.3 Traitement H_2O_2 /UV

L'étude de l'effet du couple H_2O_2 /UV sur la charge microbienne de l'eau circulante a été effectuée lors de deux essais de traitement aux concentrations de 10 et 30 ppm d' H_2O_2 .

V.2.1.6.3.1 Activité métabolique

L'évolution des concentrations de l'ATP lors des essais au couple H_2O_2 /UV est présentée dans la figure 94.

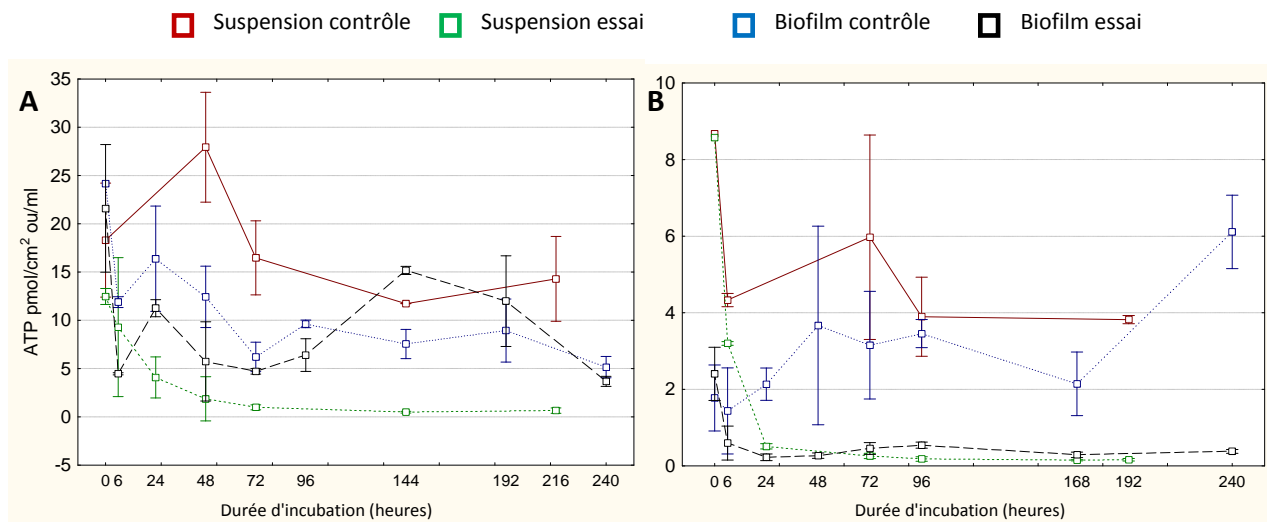


Figure 94 : Evolution des concentrations de l'ATP dans le biofilm ($pmol/cm^2$) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau ($pmol/ml$) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) au cours d'un traitement au couple H_2O_2 /UV à 10 ppm (A) et 30 ppm d' H_2O_2 (B)

Les concentrations d'ATP dans l'eau traitée diminuent significativement dès les premières heures d'application quelle que soit la concentration de l' H_2O_2 (10 et 30 ppm) (figure 94 A et B). Ces concentrations chutent au niveau minimal dès 72 h et 24 h de traitement à 10 ppm et 30 ppm d' H_2O_2 , respectivement. Elles se maintiennent à ce niveau jusqu'à la fin des expériences. Ce traitement a donc un effet significatif sur les concentrations d'ATP dans l'eau circulante mais dans les biofilms, cet effet significatif n'a été observé qu'à 30 ppm d' H_2O_2 comme cela a été préalablement décrit dans le cas des biofilms.

V.2.1.6.3.2 Bactéries cultivables

L'évolution des concentrations des bactéries cultivables lors des essais d'application du couple H₂O₂/UV est présentée dans la figure 95.

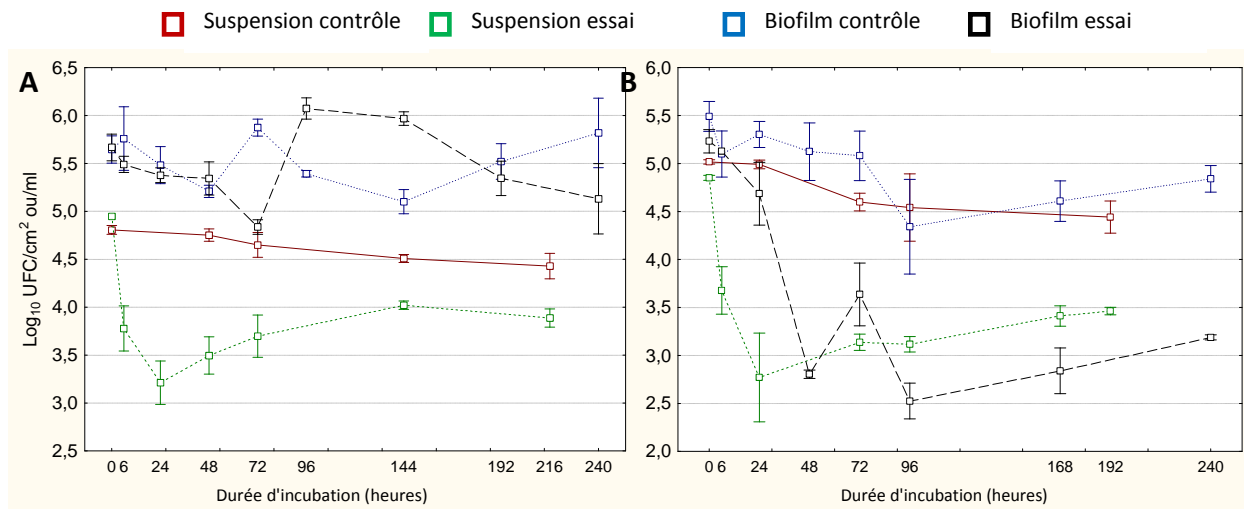


Figure 95 : Evolution des concentrations des bactéries totales dans les biofilms (Log₁₀ UFC/cm²) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau (Log₁₀ UFC/ml) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) au cours d'un traitement au couple H₂O₂/ UV à 10 ppm (A) et 30 ppm (B) d'H₂O₂.

Ce traitement a également un effet significatif sur les concentrations des bactéries cultivables en suspension quelle que soit la concentration de l'H₂O₂. Les concentrations des bactéries cultivables diminuent durant les premières heures de traitement et se stabilisent à des concentrations inférieures à celles observées dans l'eau non traitée. Un effet similaire a été observé sur les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms mais uniquement à 30 ppm d'H₂O₂. En effet, à 10 ppm d'H₂O₂, ce couplage ne réduit pas les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms.

V.2.1.6.3.3 Bactéries totales

L'évolution des concentrations des bactéries totales lors des essais au couple H₂O₂/UV est présentée dans la figure 96.

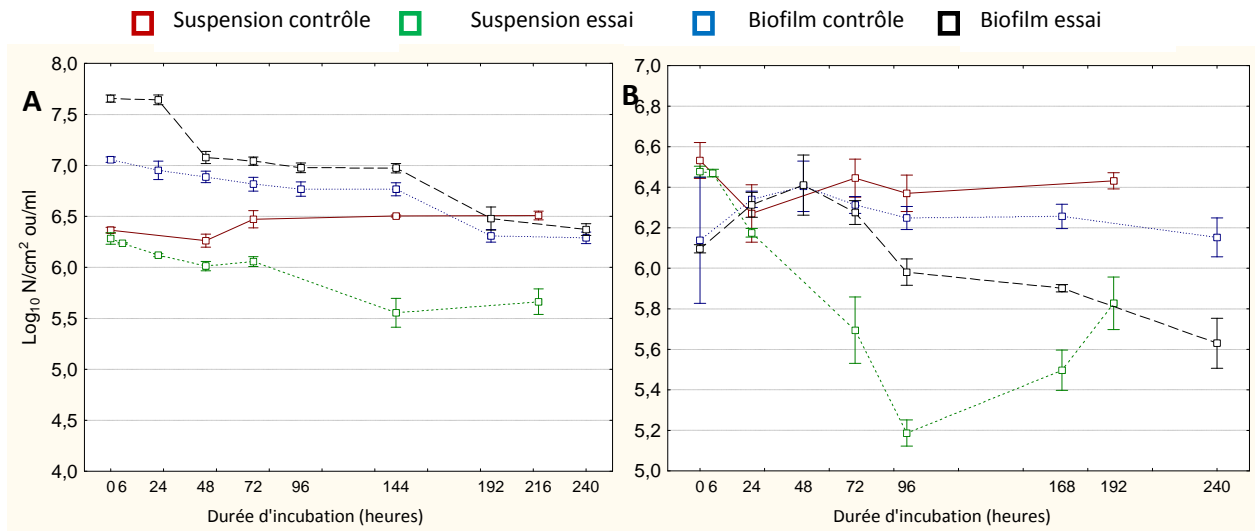


Figure 96 : Evolution des concentrations des bactéries totales dans les biofilms ($\text{Log}_{10} \text{N}/\text{cm}^2$) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau ($\text{Log}_{10} \text{N}/\text{ml}$) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) au cours d'un traitement au couple H₂O₂/UV à 10 ppm (A) et 30 ppm (B) d'H₂O₂.

Les concentrations des bactéries totales dans l'eau traitée diminuent sous l'effet de ce traitement quelle que soit la concentration de l'H₂O₂ (10 ppm ou 30 ppm). La diminution des concentrations des bactéries totales dans l'eau sous l'effet du couplage est amorcée dès le début de son application.

Ce traitement a également un effet significatif sur les concentrations des bactéries totales dans le biofilm mais uniquement à 30 ppm d'H₂O₂-UV durant lequel la diminution de ces concentrations n'est acquise qu'à partir de 96 h (figure 96 B). À 10 ppm d'H₂O₂-UV, les concentrations des bactéries totales dans le biofilm ne semblent pas varier (figure 96 A).

Conclusion

La comparaison de l'effet des traitements biocides vis-à-vis des charges microbiennes de l'eau et des biofilms montre que le traitement H₂O₂/UV ne permet pas d'obtenir les mêmes performances. Ce résultat est observé pour tous les indicateurs à 10 ppm d'H₂O₂ et uniquement pour les bactéries totales à 30 ppm d'H₂O₂. Cette discordance entre les performances des traitements vis-à-vis des microorganismes en suspension et des biofilms est surtout observée pour les traitements peu efficaces vis à vis des biofilms. Par exemple le traitement H₂O₂/UV à 10 ppm d'H₂O₂ est efficace vis-à-vis des microorganismes en suspension mais ne montre aucune performance vis-à-vis des biofilms.

Ce constat montre qu'à faible dose, les traitements biocides peuvent aboutir à des performances acceptables vis-à-vis des microorganismes en suspension mais n'ont aucun effet vis-à-vis des biofilms. Ce constat peut expliquer pour partie les processus de reviviscence et de re-contamination des installations traitées dans les tours aéroréfrigérantes. Inversement, les traitements efficaces vis-à-vis des biofilms permettent dans tous les cas évoqués ci-dessus d'aboutir à des performances élevées vis-à-vis des microorganismes en suspension. Ces résultats et ces constatations sont en parfaite concordance avec les données bibliographiques qui démontrent que les microorganismes sessiles sont plus résistants à l'effet des biocides et des antibiotiques que les microorganismes en suspension.

L'ensemble de ces analyses et ces observations renforcent donc l'intérêt et la nécessité de la prise en compte des communautés microbiennes fixées pour l'évaluation des performances des biocides et pour la détermination des conditions de leur application et du suivi de leur efficacité, notamment dans les installations réelles.

V.2.1.7 Comparaison de l'efficacité des procédés de traitements après standardisation des résultats

Afin de comparer l'efficacité des différents traitements réalisés lors d'expériences indépendantes, une standardisation des valeurs obtenues a été nécessaire. Cette standardisation permet de s'affranchir de la fluctuation des concentrations des indicateurs biologiques analysés dans les biofilms d'un essai à un autre. En effet, les concentrations initiales de ces paramètres sont variables entre les essais. Le tableau 23 présente les concentrations de ces paramètres au début de l'analyse et avant le lancement des traitements (T0). Comme il a été décrit ci-dessus, les lames de verre colonisées par les biofilms sont collectées après une durée d'incubation de 15 jours dans la source « Soufre » d'Aix Les Bains. Elles sont ensuite installées dans les réacteurs biologiques pour une étape de stabilisation avant que les traitements ne soient lancés. Les concentrations initiales correspondent alors aux mesures réalisées à la fin de la phase d'adaptation.

Ces valeurs, variables d'un essai à un autre, démontrent l'existence d'une évolution différente des concentrations de ces paramètres malgré l'homogénéité des conditions de laboratoire dans lesquelles les biofilms ont été transférés. Le biofilm est un écosystème très complexe et dynamique. Son évolution dépend de plusieurs facteurs environnementaux parfois mal maîtrisés. Lors de ces essais, nous n'avons pas systématiquement analysé les biofilms après la collecte des lames (à la fin de la phase d'incubation) de par la difficulté technique que cela représente et le temps nécessaire à l'acquisition de ces données. Les valeurs des paramètres biologiques dans les biofilms après la phase d'incubation ne sont donc pas connues précisément. Nous ne pouvons donc pas affirmer que la variabilité de l'évolution des biofilms après leurs transferts dans les conditions de laboratoire soit due à ce transfert et aux nouvelles conditions, ou à la charge microbologique des biofilms en fin d'incubation dans la source 'S'. Il se peut en effet, que la charge des biofilms en fin d'incubation soit également variable d'un essai à un autre. L'analyse des biofilms à chaque essai après la phase d'incubation aurait permis de répondre à cette problématique d'évolution hétérogène comme ça été le cas pour les essais d'adaptation.

Nous avons également démontré dans les graphiques présentés ci-dessus que les biofilms non traités (témoin) subissent une évolution au cours du temps. Nous émettons donc l'hypothèse que durant une même expérience, les biofilms traités subissent les mêmes variations que les biofilms non traités du fait qu'ils sont soumis aux mêmes conditions environnementales. Les variations des biofilms traités sont néanmoins masquées par l'effet des traitements, d'où la nécessité de prendre en compte les variations des biofilms non traités lors de la comparaison de l'efficacité de ces traitements en réalisant une standardisation.

Tableau 23 : Concentrations des paramètres biologiques du biofilms analysés à T0

Traitement	ATP pmol/Cm ²		Bactéries cultivables Log ₁₀ (N)/cm ²		Bactéries totales Log ₁₀ UFC/cm ²		Lp totales Log ₁₀ (N)/cm ²		Lp cultivables Log ₁₀ UFC/cm ²		Amibes N/cm ²	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai
H ₂ O ₂ : 30 ppm	19,69	18,57	5,9	5,75	7,44	6,83	4,55	4,44	0,3	0,35	275,28	169,81
H ₂ O ₂ : 50 ppm	0,81	0,82	4,65	4,4	5,91	5,87	3,88	3,84	0,7	0,79	37,74	56,6
UV	18,87	22,34	5,36	5,21	6,57	6,53	3,58	4,14	0,56	0,44	141,51	127,53
H ₂ O ₂ (10 ppm)/UV	11,66	21,6	5,65	5,67	7,06	7,66	2,7	2,67	0,2	0,4	152,83	147,17
H ₂ O ₂ (30 ppm)/UV	27,61	29,39	6,52	6,41	7,26	7,27	3,57	3,34	0,46	0,3	339,62	396,23
H ₂ O ₂ (50 ppm)/UV	1,8	3,19	4,31	5,55	6,46	6,78	2,7	2,81	0,7	0,6	42,92	39,62
Ecart types	10,65	11,42	0,81	0,67	0,57	0,62	0,71	0,72	0,21	0,18	122	128

La standardisation des valeurs obtenues a donc été réalisée en prenant en compte :

- 1) les écarts entre les valeurs du témoin (Tem_{T0}) et de l'essai (Ess_{T0}) à $T0$: cet écart a été pris en compte pour le calcul des valeurs du témoin standardisé Tem_{stand} à chaque prélèvement :

$$Tem_{stand(T)} = Tem_T - (Tem_{T0} - Ess_{T0})$$

T : date de prélèvement

- 2) l'évolution du témoin au cours de l'essai :

$$Ess_{stand(T)} = E_T / Tem_{stand(T)}$$

T : date de prélèvement

Tem : témoin

Ess : essai

Stand : standardisé

Dans la pratique les valeurs témoins ont été standardisées par soustraction de la valeur de l'écart au temps T_0 entre le témoin et l'essai ($Tem_{T0} - Ess_{T0}$).

Puis les valeurs des essais ont, à leur tour, été standardisées en les divisant par les valeurs standardisées des témoins correspondants ($E_T / Tem_{stand(T)}$). La valeur standardisée des essais est donc une valeur relative à celle des témoins qui varie entre 0 à 1. Plus ce rapport est proche de 0, plus le traitement appliqué est efficace.

Ainsi en faisant cette standardisation on s'affranchit des écarts à $T0$ entre les valeurs de référence (biofilms non traités) et les valeurs de l'essai (biofilms traités) ainsi que de l'évolution, au cours de l'expérience, des valeurs du témoin.

Il est démontré que l'efficacité des biocides dépend des concentrations initiales des paramètres biologiques. Cette standardisation permet de réduire ce biais puisque l'efficacité des traitements représentée par les valeurs Ess_{stand} est calculée par rapport aux valeurs (standardisées) de témoins appartenant aux mêmes essais. Dans ces conditions, la comparaison de l'efficacité de traitements obtenus lors d'essais différents devient plus acceptable.

C'est donc la valeur de l'essai standardisée (Ess_{stand}) qui sera présentée dans les graphes qui suivent ci-dessous.

V.2.1.7.1 Effet de la concentration de l' H_2O_2

Trois concentrations d' H_2O_2 ont été testées lors de ces essais : 10, 30, et 50 ppm. Les concentrations de 30 ppm et 50 ppm ont été testées en présence et en l'absence de radiations UV alors que la concentration de 10 ppm a uniquement été testée conjointement à une irradiation UV.

V.2.1.7.1.1 Analyses non spécifiques

V.2.1.7.1.1.1 En absence de rayonnement UV

Les résultats standardisés des 3 indicateurs non spécifiques : activité métabolique, bactéries cultivables et bactéries totales obtenus lors des essais de traitement à l' H_2O_2 à 30 et 50 ppm sont présentés dans la figure 97.

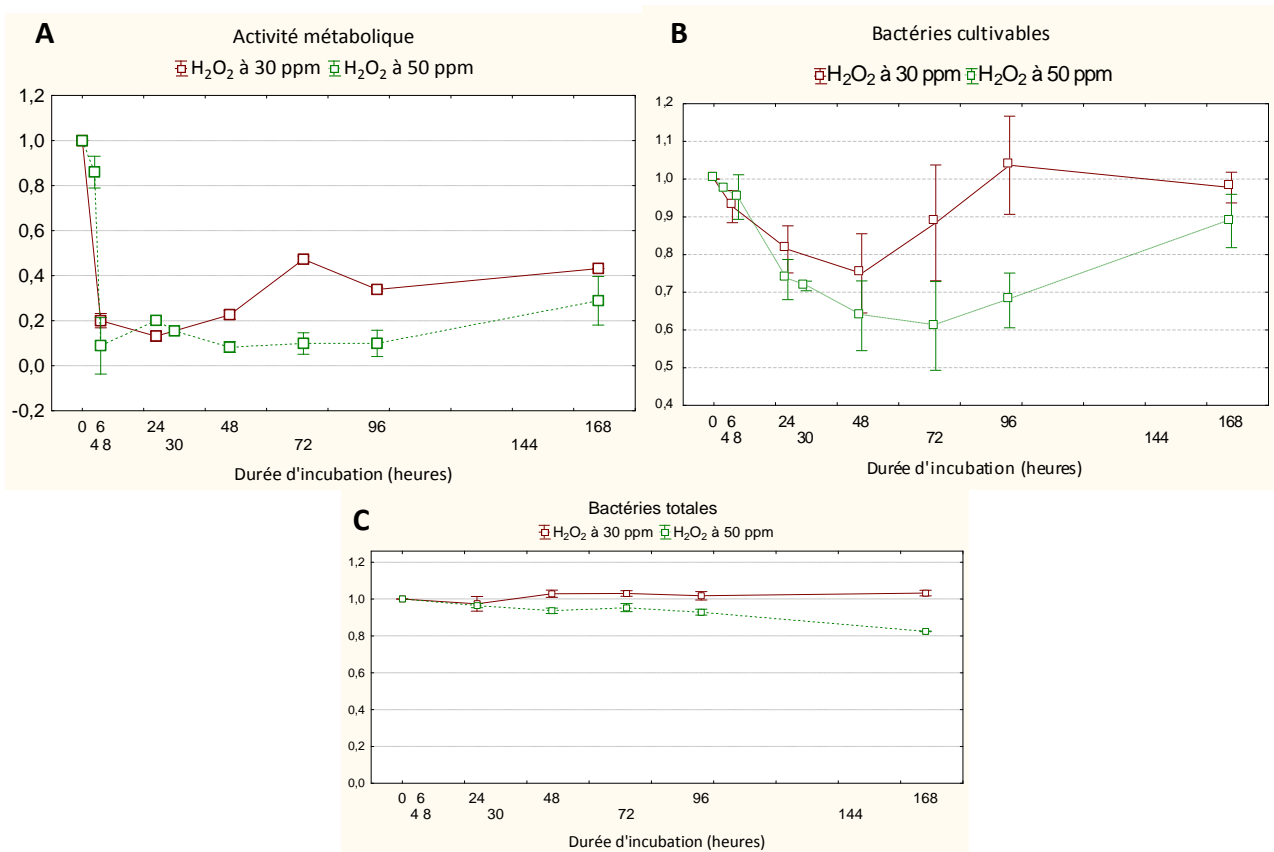


Figure 97 : Evolution des proportions Et/Tt (valeurs standardisées) de l'ATP (A), des bactéries cultivables (B) et des bactéries totales (C) lors des traitements à 30 ppm (courbes rouges) et à 50 ppm (courbes vertes) d'H₂O₂.

Ces résultats montrent qu'il est possible de distinguer 3 phases d'évolution des concentrations des bactéries cultivables : une phase descendante, une phase de plateau et une troisième phase ascendante. L'évolution des concentrations d'ATP fait apparaître également les trois phases mais la phase ascendante est de faible amplitude. Durant la première phase, descendante, l'application d'H₂O₂ à 50 et à 30 ppm permet de réduire significativement les concentrations d'ATP et de bactéries cultivables. Le calcul de la pente descendante par unité de temps permet de comparer l'efficacité des deux traitements durant cette première phase. Les tableaux 24 et 25 présentent les valeurs des pentes entre T₀ et 24 h de traitement. Le temps 24 h a été choisi comme valeur commune pour le calcul de ces pentes.

Tableau 24 : Comparaison des performances des traitements à 30 et 50 ppm d'H₂O₂ vis-à-vis des concentrations de l'ATP

H ₂ O ₂	ATP			
	% ATP éliminé à 24 h	Pente à 24 h	Valeur minimale du % d'ATP résiduel	Temps pour atteindre la valeur minimale (h)
30 ppm	80	0,034	14	24
50 ppm	84	0,035	8	24

Durant la première phase de traitement, l'efficacité des deux traitements est relativement similaire. Néanmoins les concentrations d'ATP des biofilms traités à 50 ppm diminuent jusqu'à 48 h pour atteindre une valeur minimale (8 %) inférieure à celle obtenue avec 30 ppm qui se stabilise elle, dès 24 h à une valeur minimale de 14 %.

Tableau 25 : Comparaison des performances des traitements à 30 et 50 ppm d'H₂O₂ vis-à-vis des concentrations des bactéries cultivables

[H ₂ O ₂]	Bactéries cultivables					
	% UFC (Log ₁₀) éliminé à 24 h	Log UFC éliminé à 24	Pente à 24 h	Valeur minimale du % (Log UFC) résiduel	Log UFC éliminé correspondant	Temps pour atteindre la valeur minimale (h)
30 ppm	20 (85)*	1,1	0,008	74	1,4** (92)*	48
50 ppm	36 (91)*	1,5	0,015	61	1,6** (96)*	72

*Pourcentages des UFC éliminées

**Valeur avant apparition de la reviviscence

Une tendance identique est observée pour les bactéries cultivables. En effet les proportions des bactéries cultivables résiduelles dans les biofilms traités à 50 ppm diminuent jusqu'à 72 h de traitement pour atteindre une valeur minimale de 61 % (Log₁₀ UFC) ce qui correspond à 96% d'UFC éliminées alors qu'elles se stabilisent dès 48 h et à une valeur minimale de 74 % (Log₁₀ UFC) ce qui correspond à 92 % d'UFC éliminées, avec le traitement à 30 ppm d'H₂O₂. Cependant, dans le cas des bactéries cultivables, il faut noter un effet dose de l'H₂O₂ sur l'efficacité initiale : la pente est deux fois plus forte à 50 ppm.

Les résultats de l'analyse de l'ATP et des bactéries cultivables montrent que durant cette première phase, le traitement à 50 ppm d'H₂O₂ est plus performant.

Après la phase de diminution et de stabilité des concentrations des bactéries cultivables, une phase ascendante est observée pour les deux concentrations d'H₂O₂. Cette dernière phase est amorcée pour les bactéries cultivables dès 48 h à 30 ppm d'H₂O₂ et à 96 h à 50 ppm d'H₂O₂. Concernant l'ATP, cette phase semble amorcer à 24 h mais elle est de très faible amplitude. Ce phénomène, assimilé à une reviviscence, discuté plus haut, est donc retardé sous l'effet d'une augmentation de la concentration de l'H₂O₂ de 30 à 50 ppm. En conclusion la reviviscence apparaît lors des deux traitements, mais elle semble plus précoce à 30 ppm d'H₂O₂.

Le traitement à 30 ppm d'H₂O₂ n'a aucun effet sur les concentrations des bactéries totales alors que le traitement à 50 ppm d'H₂O₂ aboutit à une faible réduction des de ces concentrations dès 48 h de traitement (de l'ordre de 20%).

Ces résultats démontrent que dans les conditions de nos essais, l'efficacité de l'H₂O₂ vis-à-vis de l'ATP, des bactéries cultivables et des bactéries totales lors de la première phase de traitement est proportionnelle à sa concentration. La reviviscence liée à l'adaptation des bactéries à l'H₂O₂ est amorcée avec les deux concentrations d'H₂O₂ testées (30 et 50 ppm), néanmoins elle est retardée avec 50 ppm d'H₂O₂.

En conclusion

Dans les conditions de nos essais, la performance à court terme (24 h) de l'H₂O₂ appliqué seul est proportionnelle à sa concentration. Aux concentrations d'H₂O₂ testées, une reviviscence est observée après un certains temps d'application, temps d'autant plus court que la concentration est faible.

V.2.1.7.1.1.2 En présence de radiations UV

Les résultats standardisés des 3 paramètres non spécifiques : activité métabolique, bactéries cultivables et bactéries totales obtenus lors des essais de traitement aux UV et au couple H₂O₂/UV à 10, 30 et 50 ppm sont présentés dans la figure 98.

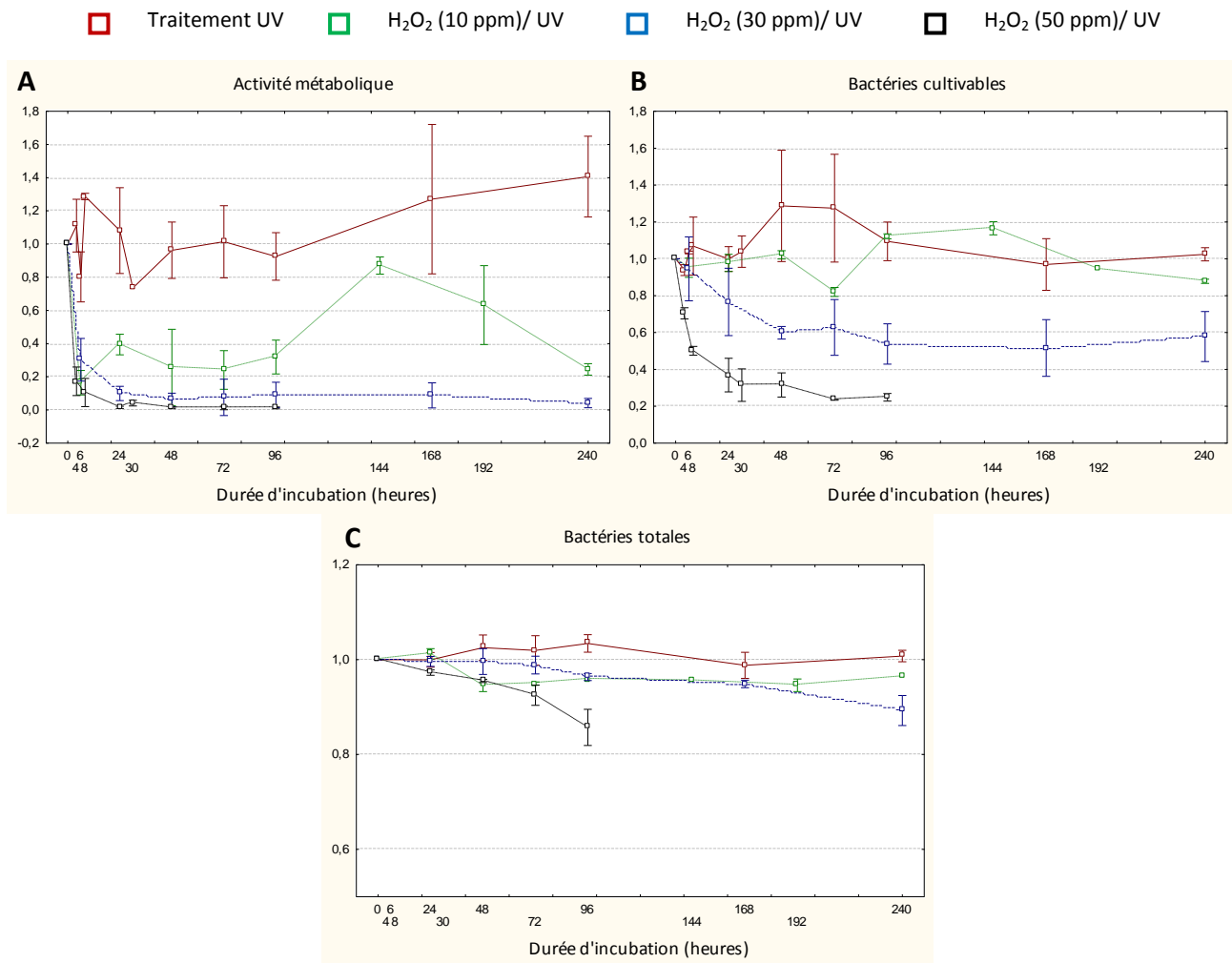


Figure 98 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin, lors des traitements à 30 ppm (courbe rouges) et 50 ppm (courbes vertes) d'H₂O₂.

Quel que soit le paramètre biologique pris en compte, l'application seule des radiations UV n'a aucun effet (figure 98). Les courbes d'évolution des indicateurs sont relativement "plates" autour d'une valeur proche de 1. Le couplage des UV à l'H₂O₂, par contre, améliore nettement la performance du traitement, cette performance dépend néanmoins de la concentration de l'H₂O₂ appliquée.

Les concentrations d'ATP baissent dès les premières heures de l'application du couplage à 10, 30 et 50 ppm d'H₂O₂. Après cette baisse significative, les concentrations d'ATP se stabilisent à des valeurs très faibles (limite de détection). A 10 ppm d'H₂O₂ les concentrations d'ATP augmentent à nouveau dès 6 h de traitement et deviennent supérieures aux valeurs observées à 30 et 50 ppm tout en restant inférieures aux valeurs du témoin (puisque les proportions de l'ATP résiduel sont inférieures à 1). Le tableau 26 résume les principaux paramètres permettant de comparer l'efficacité de ces traitements vis-à-vis de l'ATP.

Tableau 26 : Comparaison des performances des traitements aux UV et à l'H₂O₂/UV à 10, 30 et 50 ppm d'H₂O₂ vis-à-vis des concentrations de l'ATP

UV	H ₂ O ₂	ATP			
		% ATP éliminé à 24 h	Pente à 24 h	Valeur minimale du % d'ATP résiduel	Temps pour atteindre la valeur minimale (h)
OUI	/	/	/	/	/
OUI	10 ppm	60	0,025	16	6
OUI	30 ppm	90	0,037	4	24
OUI	50 ppm	98	0,45	1	24

Ces résultats montrent nettement que la performance de ce traitement est proportionnelle à la concentration de l'H₂O₂. La valeur minimale du pourcentage d'ATP résiduel à 10 ppm d'H₂O₂ est atteinte dès 6 h de traitement. Cette valeur est supérieure à celle observée à 30 et 50 ppm. De plus la concentration d'ATP augmente de nouveau après 6 h de traitement. Le pourcentage d'ATP éliminé est proportionnel à la concentration d'H₂O₂ appliquée, ainsi on observe que le plus fort pourcentage d'ATP éliminé et la plus forte vitesse d'élimination (calculée après 24 h de traitement) sont observés à 50 ppm d'H₂O₂.

Les mêmes tendances sont observées pour les bactéries cultivables à 30 et à 50 ppm d'H₂O₂ (figure 98 B). Les concentrations des bactéries cultivables diminuent significativement dès l'application des traitements et cette diminution se poursuit jusqu'à la fin des essais. À 10 ppm d'H₂O₂ ces concentrations ne varient pas significativement par rapport à celle du témoin, on observe tous de même une légère baisse au derniers prélèvement. Le tableau 27 permet de comparer les performances des 3 traitements vis-à-vis des bactéries cultivables.

Tableau 27 : Comparaison des performances des traitements au UV et à l'H₂O₂/UV à 10, 30 et 50 ppm d'H₂O₂ vis-à-vis des concentrations des bactéries cultivables

H2O2	Bactéries cultivables					
	% UFC (Log ₁₀) éliminé à 24 h (% UFC éliminée)	Log UFC éliminé à 24 h	Pente à 24 h	Valeur minimale du % (Log ₁₀ UFC) résiduel	Log UFC éliminé correspondant (% UFC éliminée)	Temps pour atteindre la valeur minimale (h)
10 ppm	2 (42)*	0,3	0,0009	82	0,54(59)*	72
30 ppm	37 (90)*	2,4	0,015	52	3,1(99)*	168
50 ppm	63 (99)*	3,5	0,026	25	4,4(99)*	96

*% UFC éliminé

Il apparait également que la performance du couplage vis-à-vis de cet indicateur dépend de la concentration de l'H₂O₂, et des flux nécessaires pour maintenir cette concentration. Le traitement à 50 ppm d'H₂O₂ qui correspond au flux le plus élevé, est le plus performant.

À 10 ppm d'H₂O₂, le rétablissement du flux d'H₂O₂ à un niveau similaire à ceux des traitements de 30 et 50 ppm (figure 76) permet d'améliorer la performance du traitement. Cependant, celle-ci n'atteint pas les performances obtenues à 30 et à 50 ppm d'H₂O₂ couplé aux UV. Ceci suggère donc l'adaptation des communautés microbiennes au traitement, adaptation qui pourrait s'expliquer par l'augmentation progressive du flux. Ce résultat met l'accent sur la nécessité d'une injection initiale et d'un flux suffisamment élevée pour prévenir l'adaptation et obtenir des performances stables.

L'étroite relation entre les performances du traitement et le flux d' H_2O_2 mise en évidence lors de l'essai de 10 ppm suggère que les performances du couplage sont liées tout à la fois aux concentrations de l' H_2O_2 et aux flux d' H_2O_2 qui servent à les maintenir.

Lors des essais à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 /UV, aucune reviviscence n'a été observée, les valeurs de l'ATP se stabilisent en effet à des valeurs très faibles et celles des bactéries cultivables se stabilisent à des valeurs qui dépendent de la concentration de l' H_2O_2 . Le couplage a donc permis de prévenir le phénomène d'adaptation observé lors des traitements à l' H_2O_2 seul, et ce pour des concentrations d' H_2O_2 identiques.

La figure 98-C montre également que les traitements aux UV seuls et à l' H_2O_2 /UV à 10 ppm d' H_2O_2 ne permettent pas de réduire les concentrations de bactéries totales. Seuls les traitements à l' H_2O_2 /UV à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 permettent de réduire significativement ces concentrations. La diminution des concentrations de bactéries totales est amorcée dès le début du traitement à 50 ppm d' H_2O_2 , elle est acquise à partir de 96 h à 30 ppm d' H_2O_2 . Ce résultat montre aussi que la performance du couple H_2O_2 /UV vis à vis des bactéries totales, dans les conditions de nos essais, dépend de la concentration de l' H_2O_2 .

V.2.1.7.1.2 Analyses spécifiques

Comme nous l'avons déjà démontré, les *L. pneumophila* cultivables ne sont pas toujours détectables lors des essais des traitements à l' H_2O_2 , aux UV et à l' H_2O_2 /UV. La comparaison des performances de ces traitements n'est donc effectuée que par rapport aux effets vis-à-vis des *L. pneumophila* totales et des amibes. L'évolution des proportions des *L. pneumophila* totales et des amibes lors des traitements à l' H_2O_2 et à l' H_2O_2 /UV à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 sont présentées dans la figure 99.

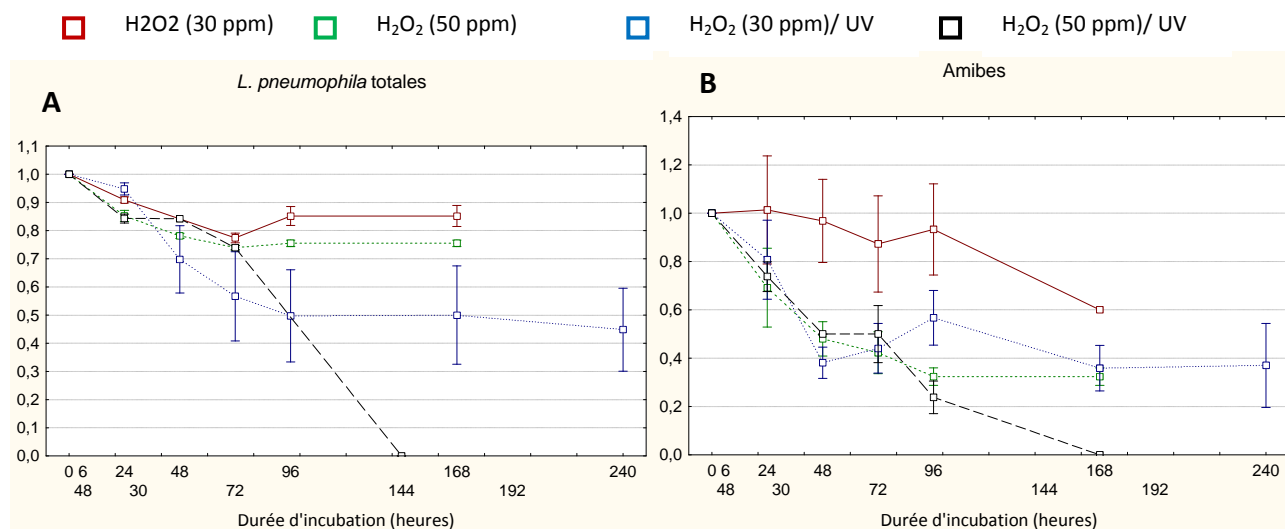


Figure 99 : Evolution des proportions de *L. pneumophila* totales (A) et des amibes (B) sous l'effet des traitements H_2O_2 et H_2O_2 /UV à 30 et à 50 ppm d' H_2O_2 .

Les résultats des essais de traitements aux UV et à l' H_2O_2 /UV à 10 ppm d' H_2O_2 ne sont pas présentés dans cette figure. Ces deux traitements n'ont aucun effet sur les concentrations de *L. pneumophila* totales et des amibes.

Les concentrations des *L. pneumophila* totales diminuent sous l'effet de ces traitements dès le début de leur application mais cette diminution est plus marquée sous l'effet du couple H_2O_2 /UV.

Les concentrations de ces bactéries tendent à se stabiliser à environ 0,8 lors de l'application isolée d' H_2O_2 et à 0,5 lors de l'application du couple H_2O_2 (30 ppm)/UV. Elles deviennent indétectables uniquement avec le couplage des UV et de 50 ppm d' H_2O_2 .

Notons par ailleurs que les résultats non standardisés montrent que les L_p totales deviennent également indétectables lors de la deuxième expérience du couplage à 30 ppm d' H_2O_2 (figure 90 B).

Les proportions des amibes résiduelles diminuent également dès le début des essais de traitement. À 30 ppm d' H_2O_2 appliqué isolément, cette diminution n'est amorcée qu'à partir de 96 h. À 50 ppm d' H_2O_2 seul, les concentrations des amibes se stabilisent dès 48 h de traitement.

Lors du traitement par le couple H_2O_2 /UV, la diminution des concentrations des amibes est amorcée dès le début de son application. Ces concentrations se stabilisent à partir de 96 h à 30 ppm d' H_2O_2 , alors qu'elles diminuent jusqu'à la fin des essais à 50 ppm d' H_2O_2 et deviennent en effet indétectables à 168 h. Aucune reviviscence des amibes n'a été observée lors des essais à l' H_2O_2 seul. Malgré les faibles concentrations des amibes, ces résultats montrent qu'à une même concentration d' H_2O_2 , la performance du couplage vis-à-vis des amibes est également plus élevée que celle de l' H_2O_2 seul.

V.2.1.7.2 Observation de processus de reviviscence

La reviviscence est mise en évidence par l'augmentation des concentrations des paramètres biologiques des biofilms au cours des essais de traitement. Ces concentrations augmentent en effet après une période de diminution et/ou de stabilisation. La reviviscence a été observée pour l'ATP et les bactéries cultivables lors des essais à l' H_2O_2 seul et uniquement pour l'ATP au cours de l'essai de traitement au couple l' H_2O_2 (10 ppm)/UV. En effet et comme nous l'avons démontré, le traitement à 10 ppm d' H_2O_2 couplé aux UV a eu un effet transitoire sur les concentrations de l'ATP et aucun effet sur les concentrations des bactéries cultivables et totales.

Afin de comparer les effets des traitements en termes de reviviscence nous avons choisi quelques paramètres permettant de la chiffrer. Le principal paramètre de comparaison est la pente de la courbe ascendante calculée entre la valeur minimale obtenue lors du traitement et la valeur obtenue à la fin de l'essai. Cette pente représente la vitesse d'augmentation des paramètres biologiques concernés par le phénomène. Le deuxième paramètre aussi important que le premier est l'heure de déclenchement du phénomène. Enfin, le dernier paramètre de comparaison est la concentration finale des paramètres à la fin du processus de reviviscence (ou la fin des observations).

Le tableau 28 donne les valeurs des paramètres indicateurs de la reviviscence observées au cours des traitements à 30 ppm et 50 ppm d' H_2O_2 seul et à 10 ppm d' H_2O_2 couplés aux UV.

Tableau 28 : Comparaison des traitements en termes de reviviscence de l'activité métabolique et des bactéries cultivables

ATP						Bactéries cultivables			
[H_2O_2]	UV	Pente (Val min-val fin)	Heure de déclenchement	Valeur min (%)	Valeur à 168 h (%*)	Pente	Heure déclenchement	Valeur à 168 h (%*)	Reviviscence (Log ₁₀ UFC)
10 ppm	Oui	0,26	6	16	63	/	/	105	/
30 ppm	Non	0,19	48	16	43	0,54	48	90	1,2
50 ppm	Non	0,28	96	9	36	0,82	72	112	1,9

*rapport essai/témoin en pourcentage

Les pentes des courbes ascendantes de l'ATP et des bactéries cultivables, sont plus élevées au cours du traitement à 50 ppm alors que ce traitement est plus efficace durant la première phase de traitement. Les concentrations des bactéries cultivables augmentent de 1,75 Log lors du traitement à 50 ppm et de 0,90 Log lors du traitement à 30 ppm. Ce résultat inattendu montre que la reviviscence, dans les conditions de nos essais, est plus importante à 50 ppm qu'à 30 ppm d' H_2O_2 . Néanmoins ce phénomène est déclenché plus tardivement à 50 ppm.

La reviviscence, plus élevée à 50 ppm, serait probablement due au fait qu'à cette concentration le traitement aboutit à une performance transitoire et à une épargne nutritionnelle plus élevées que celles observées à 30 ppm. Les bactéries résiduelles survivantes aux traitements, moins nombreuses à 50 ppm, seraient alors favorisées du fait de la réduction de la compétition nutritionnelle, de l'abondance des débris cellulaires et de l'épargne des nutriments résultant de l'action du biocide.

En conclusion

Malgré une performance initiale de l' H_2O_2 seul assez acceptable (mais inférieure à celles observée lors des couplages), ce traitement n'est pas satisfaisant du point de vue de la 'reviviscence' (nouvelle croissance pendant l'application du traitement). En effet cette efficacité est transitoire et les concentrations d'ATP et de bactéries cultivables augmentent de nouveau après un certains temps d'application.

Aucune 'reviviscence' n'a été observée pour les bactéries totales dans la limite des durées de traitement appliquées lors de nos essais. Les concentrations des bactéries totales évoluent lentement sous l'effet des traitements et la prolongation des essais aurait probablement permis de voir une évolution de ce paramètre.

Paradoxalement, cette 'reviviscence' est plus importante à 50 ppm d' H_2O_2 , alors que la performance observée lors de la première phase de traitement était plus élevée à cette concentration.

V.2.1.8 Mise en évidence du phénomène d'adaptation à l' H_2O_2

La reviviscence observée lors des essais de traitement à l' H_2O_2 seul s'accompagne d'une surconsommation de l' H_2O_2 qui serait due entre autres à l'activité catalase des bactéries survivantes. Afin de tester cette hypothèse, la quantification de ces bactéries a été réalisée par un test de catalase *in situ* sur les colonies des bactéries cultivables développées sur le milieu TSA.

Ce test a permis de mettre en évidence l'apparition d'un phénomène d'adaptation via la sélection des bactéries capables de survivre à des concentrations d' H_2O_2 qui sont, dans le cas de nos essais, sublétales. La figure 100 représente l'évolution des pourcentages des bactéries cultivables catalase⁺ lors des essais de traitement à 30 ppm d' H_2O_2 seul.

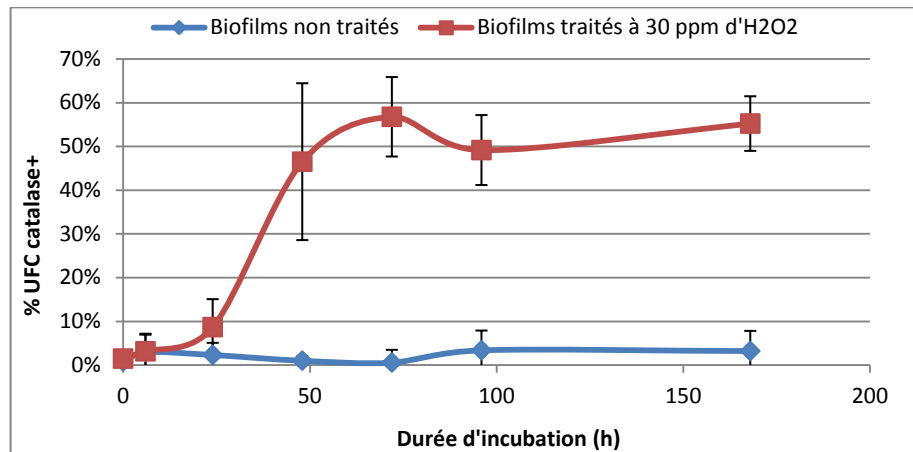


Figure 100 : Estimation des pourcentages des bactéries cultivables possédant une activité catalase par un test catalase *in situ* sur les colonies bactériennes développées sur le milieu TSA lors d'essais de traitements à 30 ppm d'H₂O₂. Les points et les barres d'erreurs représentent les moyennes et les écarts types des mesures effectuées lors de deux essais indépendants (3 mesures par essai à chaque prélèvement).

Ces résultats montrent que, dès 24 h de traitement, le pourcentage des bactéries cultivables possédant l'activité catalase augmente pour atteindre approximativement 60 % des bactéries cultivables totales. C'est donc grâce à cette activité enzymatique que les bactéries survivent et s'adaptent à la présence des concentrations sublétales d'H₂O₂. Il faut signaler ici que ce test catalase n'a pas été effectué lors des essais de traitement au couple H₂O₂/UV. Nous ne savons donc pas si les bactéries cultivables résiduelles lors de ces essais (bien que leur concentration soit faible suite à l'action du couplage) possèdent l'activité catalase.

Cette adaptation est en accord avec la surconsommation d'H₂O₂ mise en évidence par l'augmentation des flux d'H₂O₂. Cette surconsommation est donc certainement due en partie à l'activité catalase des bactéries résiduelles. Afin de confirmer la relation entre la sélection des bactéries cultivables « catalase⁺ » et la surconsommation de l'H₂O₂, des cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ ont été réalisées après l'arrêt des traitements dans les circuits traités à l'H₂O₂ seul à 30 ppm et au couple H₂O₂ (10 ppm) /UV et dans les circuits de référence correspondants.

A la fin des essais de traitement en question, les réacteurs biologiques ont été isolés du pilote et vidangés de manière à conserver uniquement les biofilms des lames de verre restantes ainsi que les biofilms qui se sont développés sur les parois des réacteurs. Ces réacteurs ont été rapidement remis en eau avec de l'eau d'une même composition que celle utilisée lors des traitements (tryptone à 0,5 ppm de COD et acides humiques à 2,5 ppm de COD).

Quatre cinétiques de dégradation de l'H₂O₂ ont été réalisées : trois ont été réalisées après les traitements à 30 ppm d'H₂O₂ seul et aux concentrations initiales des cinétiques de 30, 50 et 100 ppm d'H₂O₂ (figure 101 A, B et C respectivement) et une seule a été réalisée après le traitement à 10 ppm d'H₂O₂/UV avec une concentration initiale de cinétique de 50 ppm d'H₂O₂ (figure 101, D). Le peroxyde d'hydrogène a été injecté dans les réacteurs afin d'obtenir les concentrations recherchées et les concentrations de l'H₂O₂ ont été mesurées durant 240 minutes (figure 101).

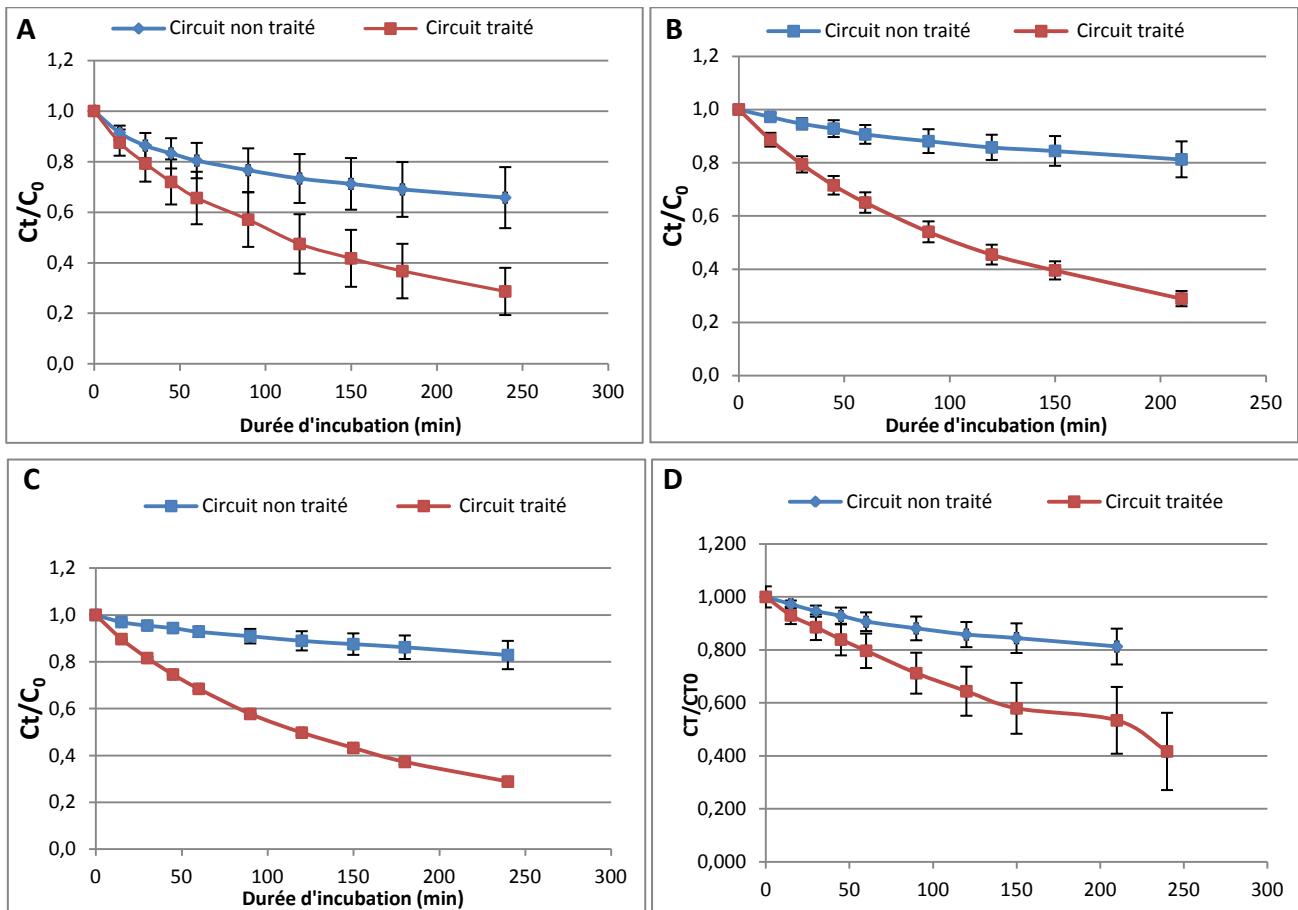


Figure 101 : A, B, C : Cinétique de dégradation de l' H_2O_2 après un traitement à l' H_2O_2 à 30 ppm, les cinétiques sont réalisées à des concentrations initiales d' H_2O_2 de 30 ppm (A) 50 ppm (B) et 100 ppm (C). D : Cinétique de dégradation de l' H_2O_2 après un traitement à l' H_2O_2 (10 ppm)/UV à une concentration initiale de 50 ppm. Circuit de référence (non traité) : courbes bleues et circuit traité : courbes rouges.

La comparaison des cinétiques de dégradation de l' H_2O_2 dans le circuit non traité et le circuit traité montrent que la vitesse de dégradation de l' H_2O_2 dans le circuit traité est plus élevée quelle que soit la concentration initiale de l' H_2O_2 . La communauté microbienne du circuit traité qui a été exposée à un traitement à 30 ppm d' H_2O_2 seul ou à 10 ppm d' H_2O_2 /UV serait à l'origine de la surconsommation d' H_2O_2 observée lors des essais de traitement.

Ce résultat confirme l'hypothèse d'une adaptation après le traitement à l' H_2O_2 mais aussi après le traitement couplant l' H_2O_2 (à 10 ppm) aux UV également. Par ailleurs, des cinétiques similaires ont été réalisées après les couplages H_2O_2 /UV à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 et après le traitement UV et n'ont montré aucune adaptation (résultats non présentés).

Il semble que l'adaptation microbienne a lieu après l'exposition à des concentrations sublétales d' H_2O_2 mais aussi à des faibles niveaux de radicaux hydroxyles comme cela a été le cas pour le traitement H_2O_2 (10 ppm)/UV, du moins au début du traitement. La prévention de ce phénomène par le couplage nécessite donc un niveau de radicaux hydroxyle au moins similaire à celui produit lors du traitement H_2O_2 (30 ppm)/UV.

Ces résultats montrent que cette reviviscence est certainement due à l'adaptation des communautés microbiennes au stress oxydatif lié à la présence de l' H_2O_2 et des radicaux hydroxyles à des concentrations sublétales.

V.2.1.9 Effet des traitements H₂O₂ seul, UV seul et du couplage H₂O₂/UV sur les concentrations des matières organiques dans l'eau de recirculation

Les concentrations de carbone organique dissous (COD) et total (COT) ont été suivies lors des essais de traitements dès le transfert des biofilms dans les incubateurs biologiques. Lors de ces essais, la matière organique a été ajoutée dans les circuits afin d'obtenir une concentration de 3 ppm en COD. La matière organique ajoutée dans les circuits est constituée d'un tiers de tryptone et de deux tiers d'acides humiques. La concentration de cette matière organique a été maintenue à 3 ppm de COD au cours de ces essais par des ajouts réguliers effectués toutes les 48 h.

La quantité de la matière organique ajoutée a été calculée par rapport à la concentration de COD mesuré avant l'ajout et la concentration ciblée qui est de 3 ppm. Pendant la phase d'adaptation, le suivi et les ajouts de la matière organique ont été effectués dans les deux circuits "référence" et "traitement" de façon indépendante. Pendant la phase de traitement ce suivi a été effectué sur les deux circuits mais les ajouts ont été effectués selon les résultats du suivi du circuit de référence. Les mêmes quantités de matière organique calculées sur la base des concentrations de COD du circuit de référence ont donc été ajoutées dans les deux circuits.

$$COD \text{ ajouté (ppm)} = 3 \text{ ppm} - COD \text{ résiduel}$$

Cette démarche a été effectuée dans la perspective d'exposer les biofilms aux mêmes conditions notamment en termes de concentrations de la matière organique. Elle permet également de mettre en évidence d'éventuels effets des traitements vis-à-vis de ces concentrations.

V.2.1.9.1 Effet de l'H₂O₂

L'évolution des concentrations de la matière organiques lors des essais de traitement à l'H₂O₂ sont présentés dans la figure 102.

Les concentrations de COD et du COT dans les deux circuits (référence et traitement) sont similaires pendant la phase d'adaptation. Pendant la phase de traitement, quelle que soit la concentration de l'H₂O₂ appliquée, les concentrations du COD et du COT sont légèrement plus élevées dans le circuit traité. Ces concentrations restent relativement stables dans le circuit de référence durant la même période.

Ces résultats montrent donc qu'il y a une accumulation de la matière organique dans le circuit traité. La stabilité relative des concentrations de COD et du COT dans le circuit de référence montre que les quantités de matières organiques qui seraient assimilées par le biofilms sont compensées par les ajouts réguliers effectués. L'ajout de matières organiques dans le circuit traité ayant été fait d'après la consommation du circuit de référence, l'augmentation de la concentration est en accord avec la diminution des paramètres biologiques observée précédemment (population microbienne amoindrie = baisse de la consommation de matières organiques). Cette augmentation a constitué une épargne nutritionnelle qui a favorisé la reviviscence constatée lors de ce traitement (H₂O₂ seul).

On note par ailleurs, que les pourcentages de COD (par rapport au COT) n'ont pas été influencés par le traitement H₂O₂ seul.

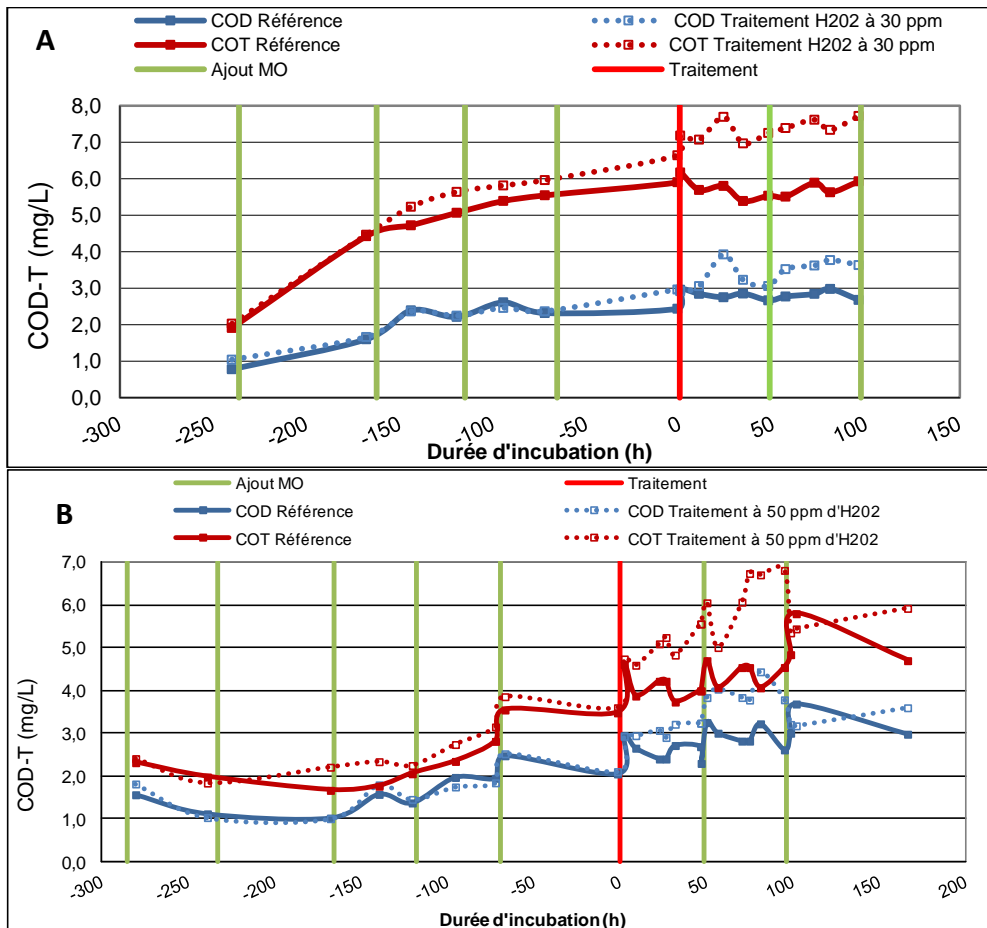


Figure 102 : Evolution des concentrations de COD et du COT lors des traitements à l'H₂O₂ à 30 ppm (A) et à 50 ppm (B). (Ajout MO= Ajout de matière organique)

V.2.1.9.2 Effet des UV

Les résultats de l'évolution des concentrations des matières organiques lors des essais de traitement UV sont présentés dans la figure 103.

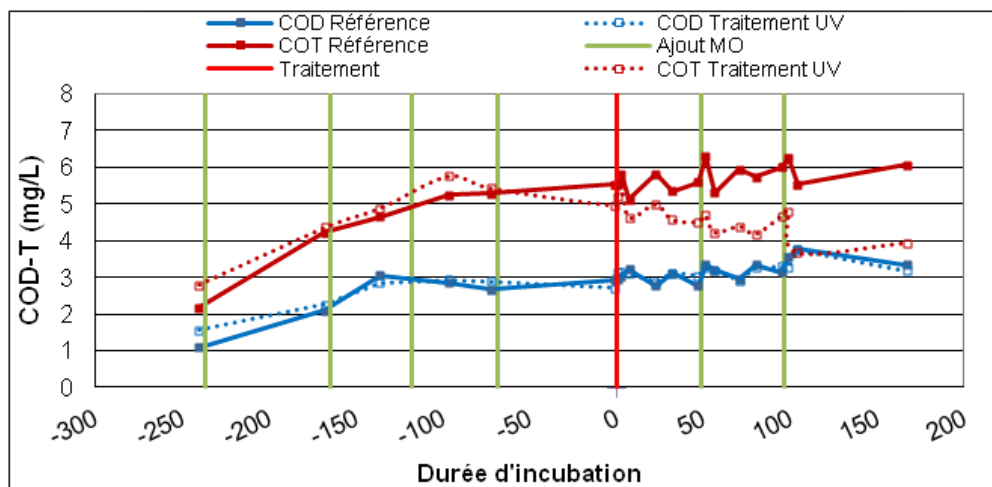


Figure 103 : Evolution des concentrations de COD et du COT lors d'un traitement aux UV.

Durant la phase de stabilisation, les concentrations du COD et du COT dans les deux circuits sont similaires. Durant la phase de traitement, les concentrations du COD dans les deux circuits

demeurent similaires alors que les concentrations de COT diminuent à partir de 50 h de traitement dans le circuit traité et deviennent inférieures aux concentrations du COT de référence. Malgré les ajouts de matière organique, les concentrations de COT diminuent sous l'effet du traitement UV. Le pourcentage de COD dans le circuit traité ($[COD]/[COT]$) augmente sous l'effet des UV, il passe en moyenne de 54% avant le traitement à 70% après le traitement.

La baisse des concentrations du COT pourrait avoir deux origines :

- la minéralisation totale du carbone organique sous l'effet des UV ;
- la diminution de la charge microbienne planctonique dans le circuit traité, les bactéries sont en effet prises en compte dans les mesures de COT.

Le pourcentage de COD dans le circuit traité ($[COD]/[COT]$) augmente sous l'effet des UV, il passe en moyenne de 54% avant le traitement à 70% après le traitement. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que le COT est décomposé en partie en COD, qui est à son tour minéralisé par le traitement ou consommé par les microorganismes (d'où la stabilité relative des concentrations du COD résultante d'un équilibre entre sa production et sa décomposition).

V.2.1.9.3 Effet du couple H_2O_2/UV

Les résultats de l'évolution des concentrations du COD et du COT lors des essais de traitement H_2O_2/UV aux concentrations de 10, 30 et 50 ppm d' H_2O_2 sont présentés dans la figure 104.

Les résultats présentés dans la figure 104 montrent que, quelle que soit la concentration de l' H_2O_2 appliquée lors du couplage avec les UV, les concentrations du COT et du COD diminuent dès le lancement du traitement. Ces concentrations restent relativement stables dans le circuit de référence. La diminution des concentrations du COD et du COT est amorcée à partir de temps de traitement variables selon la concentration de l' H_2O_2 . En effet, à 10 ppm d' H_2O_2 la diminution de ces concentrations est amorcée après 72 h de traitement pour le COT et 100 h de traitement pour le COD (figure 104 A). À 30 ppm d' H_2O_2 , cette diminution est amorcée dès le début du traitement pour le COT et après 50 h de traitement pour le COD. Enfin, à 50 ppm d' H_2O_2 cette diminution est amorcée dès le début du traitement pour le COD et le COT.

Lors du traitement à 10 ppm d' H_2O_2 , la diminution des concentrations du COT est plus précoce que celle du COD. Au cours des premières 100 h d'application du traitement, la production de COD par décomposition de COT serait compensée par une consommation de COD, d'où la stabilité des concentrations de COD. Après 100 h de traitement on observe une diminution des concentrations du COD (en plus de celle du COT), et ce malgré les ajouts de matière organique. L'équilibre observé entre la production et la dégradation du COD est rompu et la dégradation devient plus importante que la production. Cette consommation est due à la minéralisation totale du carbone organique sous l'effet de ce traitement (H_2O_2/UV).

Le même phénomène est observé lors du traitement à 30 ppm et 50 ppm d' H_2O_2 mais la diminution des concentrations du COD est plus précoce. La précocité de la diminution des concentrations de COD à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 montre que la vitesse de la décomposition du COD est supérieure à la vitesse de sa production à partir du COT (en plus des ajouts).

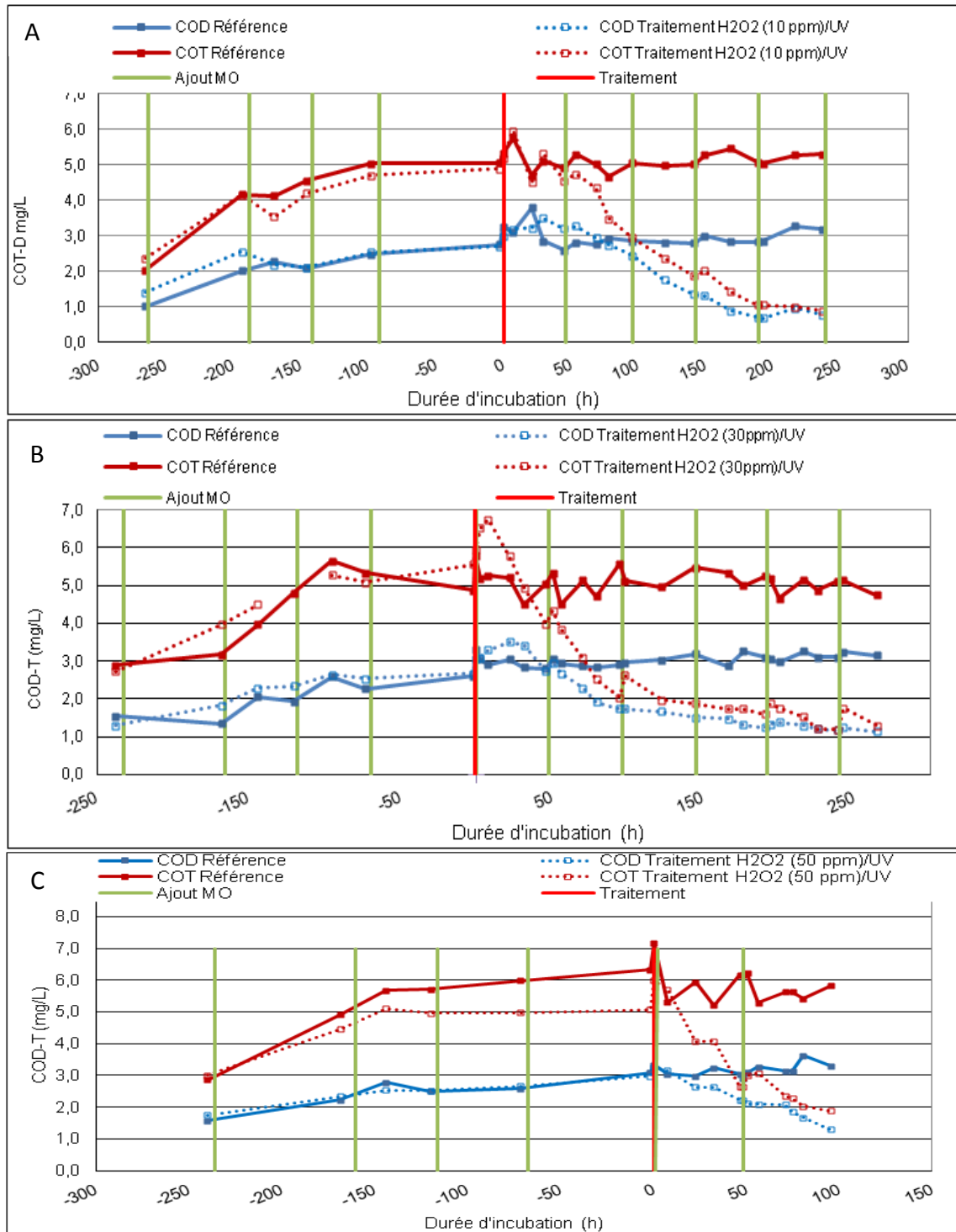


Figure 104 : Evolution des concentration du COD et du COT au cours d'un traitements par le couple H₂O₂/UV à des concentrations de 10 ppm (A), 30 ppm (B) et 50 ppm (C) d'H₂O₂

La performance de ce traitement pour la dégradation de la matière organique est proportionnelle à la concentration de l'H₂O₂. Lors de l'essai à 10 ppm d'H₂O₂ on observe deux phases, une phase de faible performance durant laquelle les concentrations du COD et du COT sont stables, et une phase de performance élevée durant laquelle les concentrations de COD et du COT diminuent. L'évolution de la concentration de l'H₂O₂ montre que cette dernière est stable tout au long de l'expérience et n'explique donc pas ce passage à une performance élevée. Cependant, le

flux d' H_2O_2 augmente durant la première phase pour atteindre un niveau similaire aux flux observés lors des essais à 50 et 30 ppm d' H_2O_2 . C'est donc cette augmentation du flux d' H_2O_2 qui serait à l'origine de cette augmentation de la performance du traitement. La figure 105 présente l'évolution simultanée de la concentration et du flux d' H_2O_2 ainsi que les concentrations du COD et du COT lors de l'essai à 10 ppm.

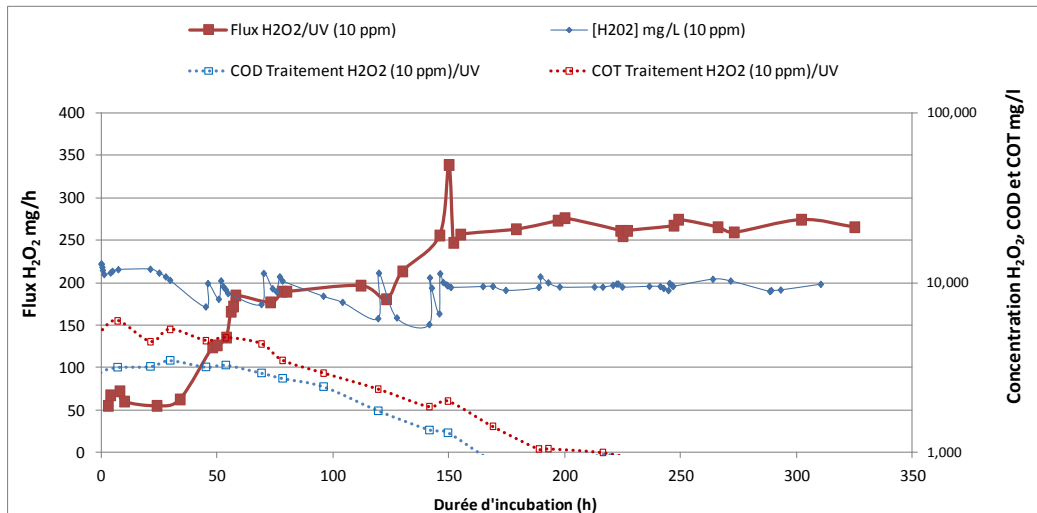


Figure 105 : Evolution simultanée des flux, de la concentration d' H_2O_2 et des concentrations du COD et du COT lors du traitement à 10 ppm d' H_2O_2/UV

La diminution des concentrations de COD et de COT n'est observée qu'à partir d'un certain niveau de flux qui est de 200 mg/h. La performance de ce traitement pour la dégradation de la matière organique dépend donc du flux de l' H_2O_2 . Lors des essais à 30 et 50 ppm, le flux maximal a été atteint dès les premières heures de traitement ce qui explique le niveau de performance élevée. C'est le flux d' H_2O_2 , indépendamment de sa concentration, qui déterminerait donc la performance de ce traitement vis-à-vis de la matière organique.

V.2.2 Effet des traitements UV, H_2O_2 et du couple H_2O_2/UV sur les concentrations du carbone organique dissous et du carbone organique dissous biodégradable en l'absence de biofilms.

La matière organique naturelle est composée de deux fractions : une fraction biodégradable et une fraction réfractaire. C'est la fraction biodégradable à laquelle nous nous intéressons dans cette partie, qui constitue une source de nutriments pour les microorganismes. La matière organique biodégradable est constituée d'une multitude de composés organiques : acides humiques, acides flaviques, acides carboxyliques, acides aminées, protéines, glucides. Du fait de ses constituants très variés et de sa faible concentration, les méthodes chimiques classiques ne permettent pas de mesurer facilement les concentrations de chacun de ces composés dans la matière organique biodégradable.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer l'effet de ce traitement sur la fraction biodégradable du carbone organique. Pour cela nous avons utilisé les mêmes sources de matière organique que celles de nos expérimentations et le même dispositif expérimental.

Les trois essais de cette étude ont été réalisés de façon indépendante et différent sur le plan de la composition et de la modalité de préparation des solutions de matières organiques utilisées. Les résultats sont donc présentés séparément. Nous avons vérifié en parallèle de ces expériences que

l'ajout de la catalase pour la dégradation de l' H_2O_2 résiduel ne modifie pas les concentrations du COD et du COT. Sauf indication, les points et les barres d'incertitudes sont les moyennes et les écarts types de trois mesures.

V.2.2.1 Résultats de l'essai 1

V.2.2.1.1 Concentrations de COT et de COD après les traitements et avant incubation (J0)

Les résultats des mesures des concentrations de COD des solutions de matières organiques sont présentés dans la figure 106.

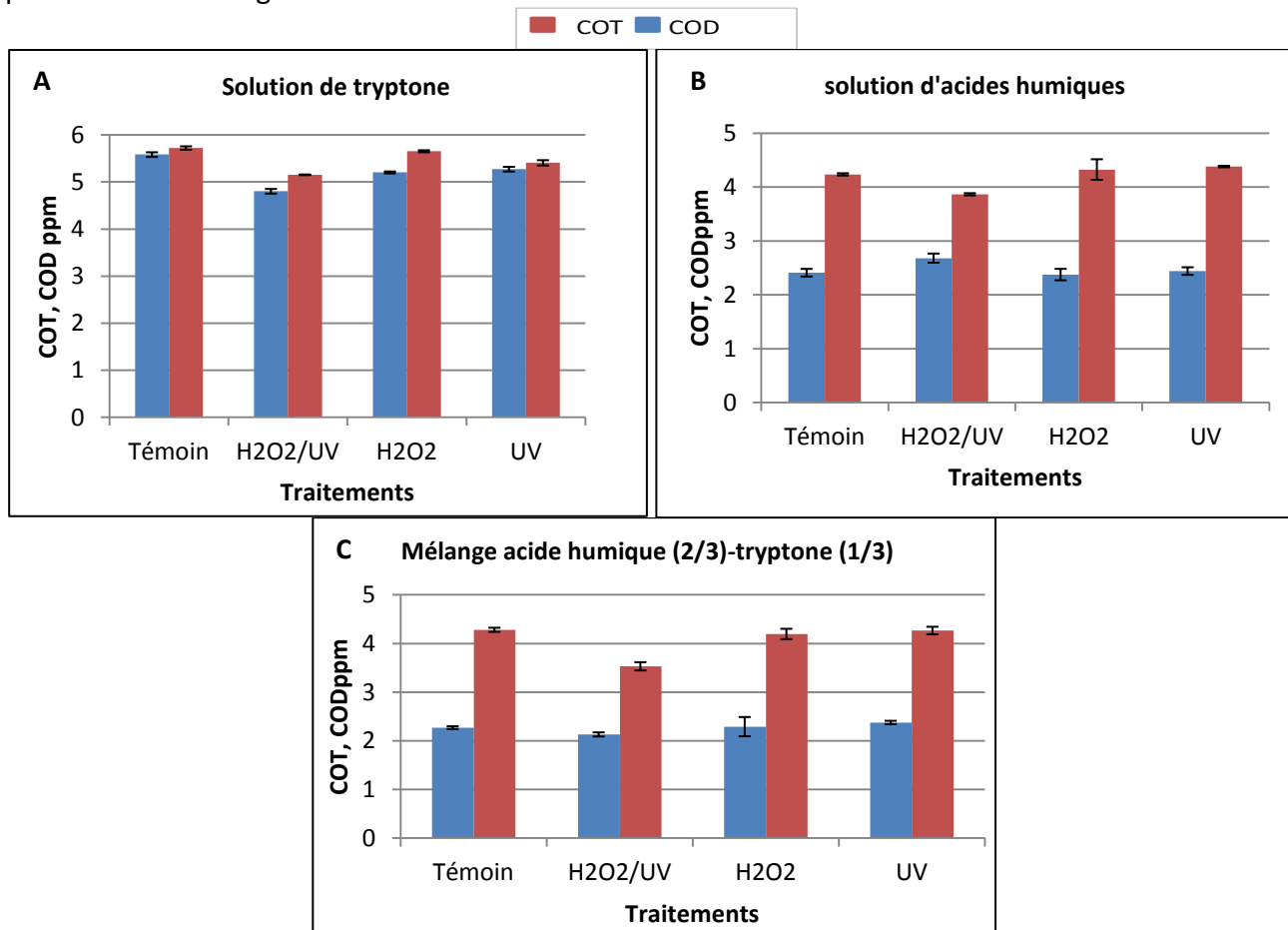


Figure 106 : Concentrations de COD (colonnes bleues) de COT (colonnes rouges) des solutions de matière organiques : (A) solution de tryptone, (B) solution d'acides humiques, (C) mélange acides humiques tryptone.

Les résultats montrent que les traitements H_2O_2 et UV (appliqués séparément) ne génèrent pas de variations marquantes des concentrations de COT et de COD. L'application du traitement H_2O_2/UV a des effets différents selon la composition des solutions traitées. En effet on observe :

- une baisse des concentrations du COD et du COT dans le cas de la solution de tryptone ;
- une légère augmentation de la concentration du COD et une baisse de la concentration du COT dans le cas de la solution d'acides humiques, variations opposées dont on peut penser qu'elles sont en correspondance ;
- une baisse de la concentration du COT du mélange.

Les pourcentages de COD et de COT éliminés de la solution de tryptone après les traitements sont présentés dans le tableau 29. Ce tableau confirme ces observations en montrant que les

pourcentages de variation des concentrations du COD et du COT de la solution de tryptone, par référence aux concentrations initiales, sont plus élevés sous l'effet du traitement H₂O₂/UV que sous l'effet des deux autres traitements.

Tableau 29 : Pourcentages de COD et du COT (COT (D)_{témoin}/ COT (D)_{après traitement}) éliminés de la solution de tryptone après les traitements biocides.

	% COD éliminé (M*)	ET**	% COT éliminé (Moyenne)	Ecart types
H₂O₂/UV	13,97	0,0165	9,08	0,68
H₂O₂	6,80	0,0045	1,22	0,98
UV	5,55	0,005	5,50%	1,57

M* : moyennes, ET** : écarts types

Les pourcentages de COD et de COT éliminés sont plus élevés sous l'effet du traitement H₂O₂/UV. Il faut noter ici, que les concentrations de COD et de COT de la solution de tryptone sont globalement similaires et que le COD représente 93,59 % ±1,53 du COT. La tryptone est un mélange de matières organiques facilement biodégradables et ne contient pas (ou très peu) de carbone particulaire.

Comme nous l'avons déjà mentionné Les concentrations de COT de la solution d'acides humiques et du mélange (acides humiques-tryptone) baissent également après le traitement H₂O₂/UV. Elles ne varient pas après l'application isolée des autres traitements (H₂O₂ et UV) pour les deux solutions. La baisse de la concentration de COT de la solution d'acides humiques après le traitement H₂O₂/UV s'accompagne d'une augmentation de la concentration de COD (figure 106 B), ce qui explique les variations observées des pourcentages de COD dans les solutions de matières organiques sous l'effet des traitements. Ces pourcentages sont présentés dans le tableau 30.

Tableau 30: Pourcentages de COD (COD/COT) dans les solutions de matières organiques

	Solution de tryptone (M*)	ET**	Solution d'acides humiques (M*)	ET**	Mélange (M*)	ET**
Témoin	95,07%	1,41%	56,90%	1,38%	58,06%	0,74%
H₂O₂/UV	93,21%	0,83%	69,35%	2,58%	72,40%	1,94%
H₂O₂	92,04%	0,72%	54,91%	0,03%	56,97%	0,09%
UV	94,04%	1,83%	55,71%	1,43%	57,35%	2,54%

M* : moyennes, ET** : écarts types

Le tableau 30 montre que le pourcentage de COD de la solution de tryptone ne varie pas. Celui des solutions d'acides humiques et du mélange augmentent uniquement après l'application du traitement H₂O₂/UV. Ce pourcentage passe en effet de 57% (témoin) à 69% après traitement pour la solution d'acide humiques, et de 58% (témoin) à 72% après traitement pour le mélange. Le traitement H₂O₂/UV a donc eu pour effet de diminuer les concentrations de COT et de COD de la solution de tryptone et a augmenté la proportion initiale de COD des solutions d'acides humiques et du mélange acide humiques-tryptone. La production de petites molécules organiques à partir d'acides humiques sous l'effet du couple H₂O₂/UV est un processus plusieurs fois décrit dans la bibliographie (Wang *et al.*, 2000 ; 2006).

V.2.2.1.2 Evolution des concentrations du COD à T30 et à T35

Les concentrations de COD des solutions ensemencées par la suspension bactérienne évoluent significativement au cours de l'incubation. Cette évolution est différente selon la composition des solutions de matières organiques. La figure 107 présente l'évolution des

concentrations de COD des différentes solutions (traitées et non traitées) après 30 et 35 jours d'incubation.

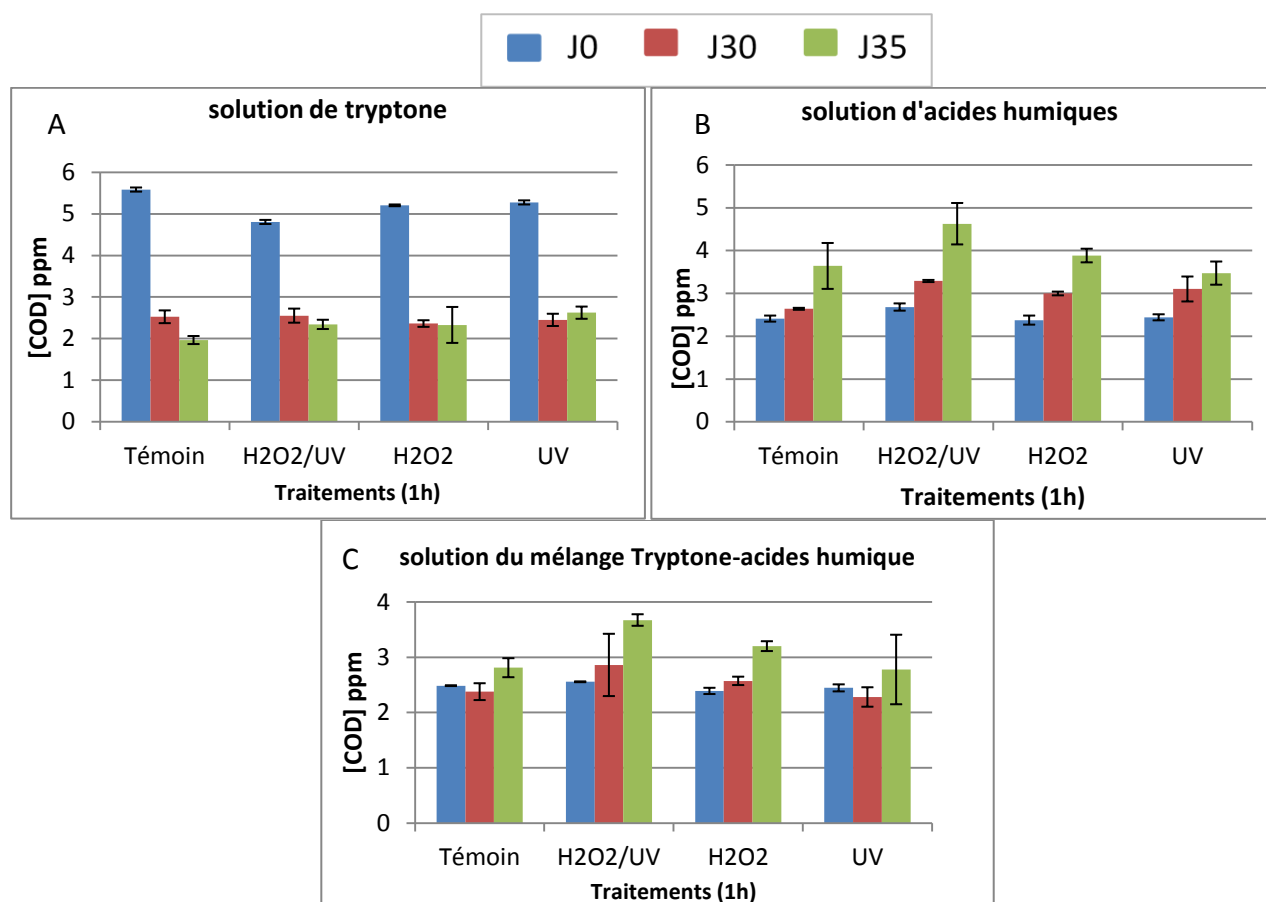


Figure 107 : Concentrations du COD des 3 solutions, (A) solution de tryptone, (B) solution d'acides humiques, (C) mélange acide humique-tryptone à J0 (colonnes bleues), J30 (colonnes rouges) et J35 (colonnes verte).

Les concentrations du COD de la solution de tryptone (figure 107 A) diminuent significativement entre J0 et les deux jours de contrôle (J30 et J35) marquant la fin de l'incubation. Cette diminution est une conséquence de la consommation de la matière organique biodégradable représentant le CODB, par l'inoculum bactérien durant ce laps de temps. Dans le cas des deux autres solutions, les concentrations du COD des deux autres solutions de matières organiques (figure 107-B et C), contrairement aux attentes, augmentent malgré la présence de l'inoculum bactérien. Cette augmentation est plus ou moins significative selon le traitement subi et la composition de la solution considérée. Le tableau 31 résume les pourcentages d'augmentation des concentrations de COD en fin d'incubation dans les différents cas.

Tableau 31 : Pourcentages d'augmentation des concentrations du COD (COD J35/ COD J0) en fin d'incubation (J35)

Traitements	Solution acides Humiques*	Ecart type	Mélange acides humiques-tryptone*	Ecart type
Témoin	41,04%	10,86%	13,08%	1,65%
H ₂ O ₂ /UV	71,34%	6,86%	47,79%	4,30%
H ₂ O ₂	57,10%	7,20%	28,77%	3,56%
UV	44,17%	12,03%	11,77%	3,96%

*Pourcentages sont calculés par rapport à la valeur initiale (J0)

L'augmentation de la concentration de COD est nettement supérieure sous l'effet du couple H₂O₂/UV par rapport à celle observée pour les autres traitements. Cette augmentation représente

respectivement, 71,3% et 47,8% de la concentration initiale de la solution d'acides humiques et du mélange acides humiques – tryptone, respectivement.

V.2.2.1.3 Evolution du carbone organique dissous biodégradable de la solution de tryptone

Seule la solution de tryptone fait état d'une proportion mesurable de CODB. L'augmentation des concentrations du COD observée avec la solution d'acides humiques et avec le mélange rend impossible l'estimation des concentrations du CODB. La consommation du COD par les bactéries est en effet masquée par une production plus importante.

L'augmentation de la concentration de COD à la fin de l'incubation dans le cas du mélange, observée à J30 ou J35, résulte des processus de consommation et de production de COD qui se sont déroulés durant l'incubation. La production de COD dans un milieu contenant des formes dissoutes et notamment biodégradable (apporté par la tryptone) et particulaires (COP) de matières organiques peut avoir plusieurs origines :

- L'activité bactérienne :
 - o la solubilisation du COP sous l'effet des exo enzymes produits par les bactéries ;
 - o le COD issu de la lyse de bactéries ;
 - o la production de COD représentée par les exsudats et sécrétas des cellules bactériennes ;
- la fragilisation des particules par les traitements, qui seraient par la suite plus accessibles à l'action des bactéries ;
- une solubilisation "spontanée", sous l'effet des caractéristiques physiques et chimiques du milieu dans lequel les particules sont en suspension.

Les processus de production de COD ont donc été dominants malgré la présence initiale de CODB, qui dans le cas du mélange est apporté sous la forme de tryptone. Le CODB aurait pu stimuler l'activité bactérienne au sens large et donc en particulier, son action de dégradation du COP, ce constat vaut probablement aussi pour la solution d'acides humiques même en l'absence de tryptone.

Les concentrations de CODB des solutions de tryptone traitées et non traitée (témoin) sont présentées dans la figure 108. Elle permet d'analyser l'évolution de la concentration de CODB de la solution de tryptone en fonction des traitements appliqués.

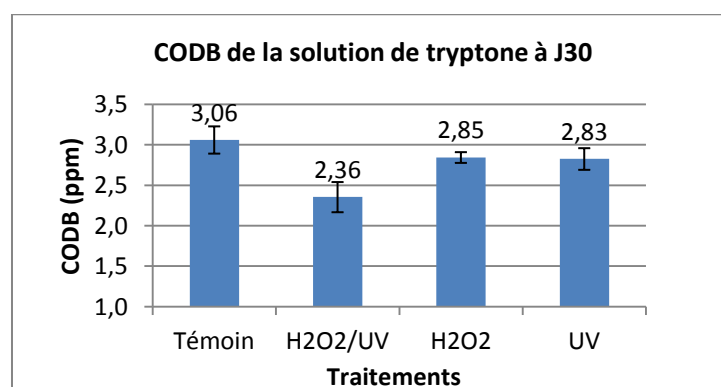


Figure 108 : Evolution des concentrations de carbone organique dissous biodégradable (CODB) d'une solution de tryptone sous l'effet de 3 traitements biocides.

Les concentrations de CODB des solutions traitées sont inférieures à celle de la solution non traitée. La concentration la plus basse du CODB est obtenue sous l'effet du couple H₂O₂/UV. Ceci

semble indiquer que les traitements (et en particulier le couple H₂O₂/UV) sont à l'origine de la consommation d'une partie du CODB initial de la solution de tryptone.

Nous avons calculé le pourcentage de CODB de ces solutions (tableau 32).

Tableau 32 : Variation du pourcentage de CODB de la solution de tryptone en fonction des traitements. Pourcentages calculés par référence à la concentration en COD à t0 (immédiatement après les traitements).

Traitements	% CODB	Ecart type
Témoin	54,81%	2,86%
H ₂ O ₂ /UV	44,19%	2,71%
H ₂ O ₂	54,66%	1,41%
UV	53,59%	2,65%

Les pourcentages de CODB (pourcentages calculés par référence à la concentration en COD à T0) des solutions traitées à l'H₂O₂ et aux UV ne varient pas par rapport à celui de la solution non traitée alors que la valeur initiale de COD (T0) de cette solution de tryptone diminue sous l'effet de ces traitements (figure 106). Ce constat pourrait être expliqué par un équilibre entre la dégradation et la production du CODB par les traitements : la dégradation du CODB pourrait être compensée par une production suite à la dégradation du COD au sens large, d'où la stabilité de ces proportions.

A l'opposé, celui de la solution traitée à l'H₂O₂/UV (44,19%) est significativement inférieur au CODB du témoin (54,81%) et à celui des solutions qui ont subi les autres traitements. Ce traitement agirait sur la proportion du CODB de la solution de tryptone.

Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que l'oxydation complète d'une partie de la matière organique du fait du traitement, ait plus touché le CODB que le CODR (COD réfractaire). L'une des explications alternatives pourrait être la subsistance dans cette solution, "d'éléments" défavorables à l'activité bactérienne et qui auraient été générés par le traitement.

En conclusion

Cet essai montre que seul le couple H₂O₂/UV a un effet significatif sur les concentrations de COD et de CODB de la solution de tryptone, constituée principalement de COD. Les résultats de ce premier essai montrent également qu'il est impossible de mesurer l'effet des traitements appliqués sur le CODB de la solution d'acides humiques et la solution d'acides humique/tryptone du fait de l'augmentation de la concentration de COD après l'incubation en présence d'un inoculum bactérien. Nous avons attribué cette augmentation à la présence de particules de carbone dans ces solutions qui, sous l'effet des traitements et de l'activité bactériennes, seraient à l'origine de la production de COD. Le deuxième essai prend en compte ce résultat et le protocole de préparation de la solution d'acides humiques comporte des étapes supplémentaires visant à éliminer ces particules.

V.2.2.2 Résultats de l'essai 2

Afin de s'affranchir des problèmes liés à la présence de particules dans les solutions d'acides humiques, deux étapes supplémentaires ont été introduites dans le protocole de préparation de ces solutions. Pour mettre en évidence l'effet de ces modifications nous avons fait cet essai sur deux solutions, l'une préparée selon la modalité standard et l'autre préparée selon un nouveau mode opératoire.

V.2.2.2.1 Caractérisation des solutions de matière organique

Deux solutions d'acide humiques ont été préparées selon deux protocoles distincts. La première solution a été préparée par dilution de la solution mère d'acides humiques (1 g/L) et filtrée sur des

tamis de 60 et 20 μm . Cette solution a été désignée « solution standard ». La deuxième a été préparée par dilution de la solution mère (1 g/L), filtrée sur des tamis de 60 et 20 μm , centrifugée à 15000 g et filtrée de nouveau sur une membrane de polycarbonate de 0,2 μm de porosité. Cette solution a été désignée « solution filtrée ». Les concentrations en COT et en COD de ces solutions sont présentées dans la figure 109.

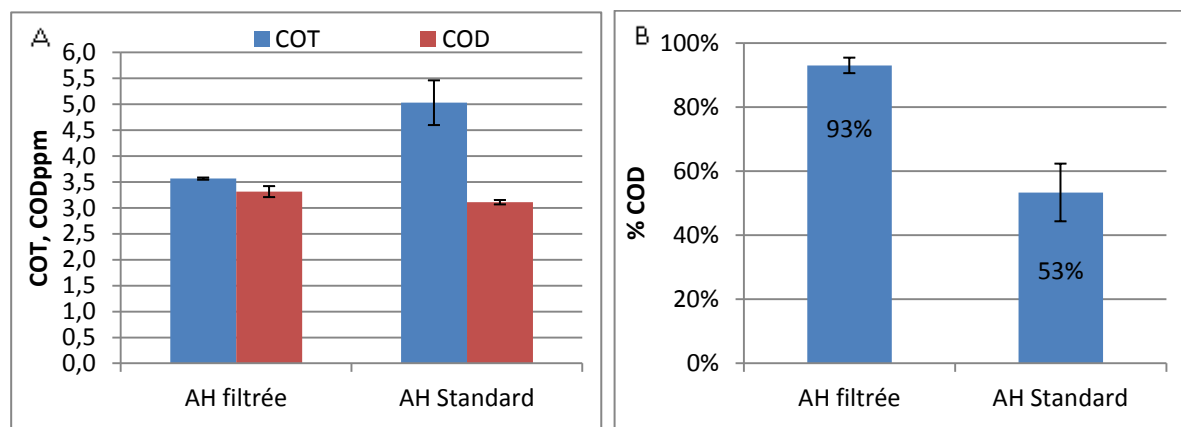


Figure 109 : Caractérisation des solutions d'acides humiques : (A) concentrations du COT et du COD et (B) pourcentages de COD des solutions d'acides humiques.

La concentration finale en COD souhaitée pour ces solutions était de 3 ppm. Cet objectif a été atteint puisque les concentrations en COD des deux solutions sont similaires et proches de cette valeur (3,31 ppm pour la solution filtrée et 3,11 ppm pour la solution standard).

Les concentrations en COT des deux solutions sont évidemment différentes : 3,5 ppm pour la solution filtrée et 5 ppm pour la solution standard. Les pourcentages de COD dans les deux solutions sont donc différents et représentent plus de 90% du COT dans la solution filtrée et 50 % dans la solution standard. La centrifugation et la filtration (sur filtre de 0,2 μm de porosité) ont donc permis d'éliminer un maximum de carbone particulaire dans la solution d'acides humiques filtrée.

V.2.2.2.2 Effet du traitement $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ sur les concentrations de COT et de COD

Les deux solutions d'acides humiques ont été exposées, pendant 24 h, à un traitement à l' H_2O_2 (50 ppm)/UV (60 mJ/cm^2 254nm). Des prélèvements ont été effectués à différents temps d'exposition (0, 1 h, 6 h et 24 h), le COD et le COT de ces solutions ont été dosés et les résultats sont présentés dans la figure 110.

Les concentrations de COD et de COT des deux solutions n'évoluent pas de la même manière sous l'effet du traitement appliqué. Les concentrations du COT des deux solutions baissent mais selon des cinétiques différentes, le taux d'élimination du COT de la solution filtrée étant plus élevé que celui de la solution standard (figure 110-B).

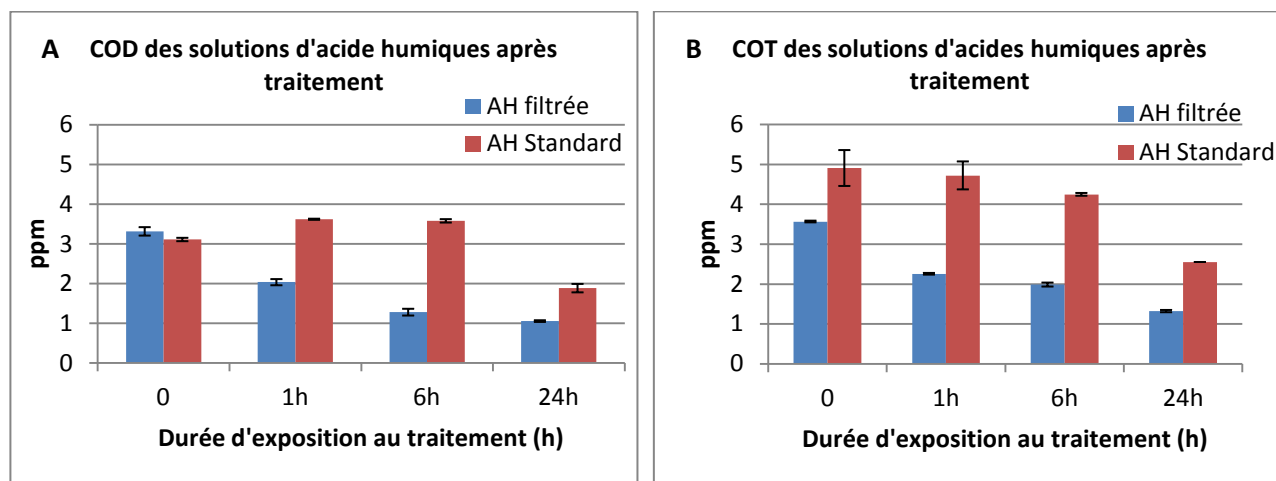


Figure 110 : (A) Concentrations du COD et (B) du COT des solutions d'acides humiques filtrée et standard en fonction de la durée d'exposition aux traitements H_2O_2 (50ppm)/ UV_{254nm} .

La différence entre les deux solutions est plus marquée au sujet de la concentration en COD. Celle de la solution filtrée baisse dès 1 h d'exposition et tout au long de l'augmentation du temps d'exposition. Celle de la solution standard augmente après 1 h d'exposition, garde approximativement la même valeur à 6h et ne baisse qu'après 24 h d'exposition (figure 110-A).

Ces données semblent indiquer la formation de COD à partir du carbone organique particulaire ou COP (qui représente la différence entre le COT et le COD) sous l'effet du traitement. Cette hypothèse explique deux observations au niveau de la solution standard :

- l'augmentation du COD après 1 h de traitement ;
- la stabilisation de la concentration du COD entre 1 h et 6 h accompagnée d'une baisse de la concentration du COT.

Le tableau 33 donne les pourcentages de COD et de COT éliminés après différentes durées d'exposition au traitement.

Tableau 33 : Proportions de COD et de COT résiduel après l'exposition au traitement H_2O_2 (50ppm)/ UV_{254nm} pendant 1h, 6h et 24 h

Durée d'exposition	Solution filtrée		Solution standard	
	%COD résiduel	%COT résiduel	%COD résiduel	%COT résiduel
1 h	61 (39)*	63	116	4
6 h	51 (49)*	56	115	13
24 h	32 (68)*	27	61	48

* % du COD éliminé représenté dans la figure 113

Les proportions de COD et de COT éliminés de la solution d'acides humiques filtrée sont supérieures à ceux de la solution standard, pour toutes les durées d'exposition. Ce constat pourrait être interprété par un effet de masque (quenching) de l'irradiation UV exercé par les particules en suspension, plus nombreuses dans la solution standard.

Le pourcentage de COD éliminé de la solution filtrée après 1 h de traitement (39%) est supérieur au pourcentage de COD éliminé de la solution de tryptone observé dans l'essai 1 (14%, tableau 29). Cette différence significative pourrait s'expliquer également par l'effet de quenching des UV lié à la concentration initiale en COD des deux solutions. En effet la concentration initiale du

COD de la solution de tryptone (5,6 ppm) est supérieure à celle de la solution d'acide humique filtrée (3,11 ppm). Sarathy *et al.* (2007) ont montré en effet que l'oxydation de la matière organique sous l'effet de ce traitement était plus efficace à faible concentration de cette dernière.

V.2.2.2.3 Evolution des concentrations de COT et du COD après 30 et 35 jours d'incubation

L'ensemble des solutions d'acides humiques traitées et non traitées ont été ensemencées par une suspension bactérienne puis incubées à 25°C sous agitation pendant 35 jours. Le COD et le COT de ces solutions ont été dosés à 30 et 35 jours d'incubation.

L'évolution des concentrations de COD des solutions d'acides humiques standard et filtrée est présentée dans la figure 111.

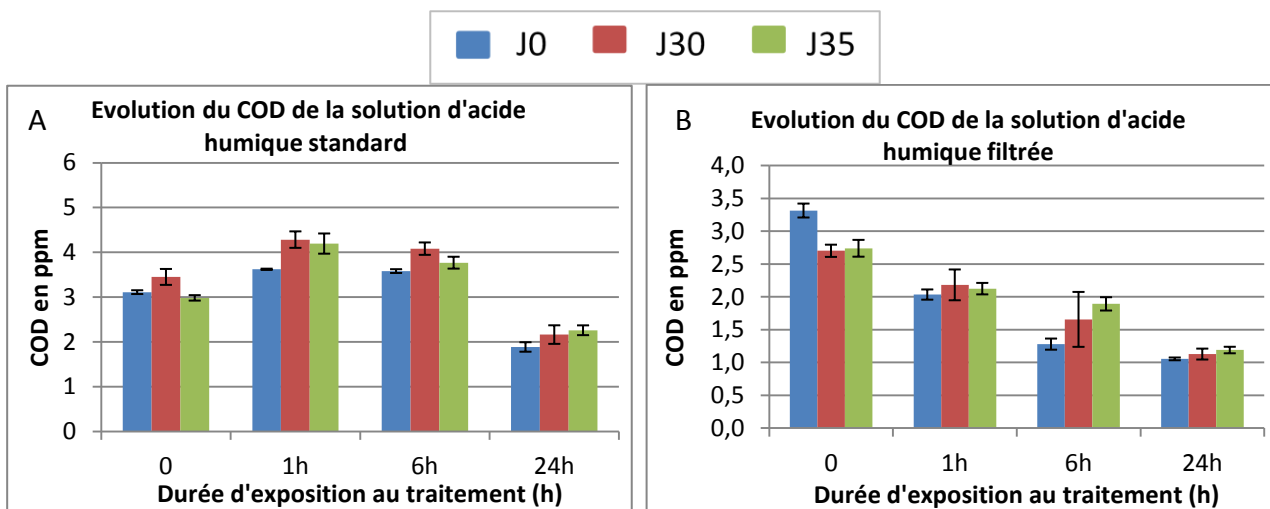


Figure 111 : Evolution des concentrations en COD : (A) des solutions standards, (B) des solutions filtrées

La concentration de COD des solutions standards augmentent pour les solutions traitées pendant 1 et 6 h au cours de l'incubation (figure 111-A). Cette augmentation est la conséquence d'une production de COD, supérieure à sa consommation par l'inoculum bactérien. La production de COD pourrait être due (comme nous l'avons déjà signalé) à :

- l'hydrolyse du carbone particulaire dans les conditions de l'incubation par le traitement et par l'activité bactérienne ;
- la lyse des cellules bactériennes et le relargage de leur contenu.

Il est donc impossible de calculer la fraction biodégradable du carbone organique (CODB) de la solution d'acides humiques standard, la consommation bactérienne de COD durant l'incubation, ayant pu être masquée par une production plus importante.

Ce résultat confirme l'importance de la dégradation du carbone particulaire dans la genèse de COD comme le montre la comparaison des résultats correspondants aux deux solutions.

L'information nouvelle apportée par les résultats obtenus avec la solution filtrée (figure 111 B) est double :

- aucun changement de la concentration en COD durant l'incubation pour les solutions traitées pendant 1 h et 6 h : l'activité bactérienne pourrait être inhibée sous l'effet des modifications des solutions résultantes de l'effet du traitement. Parmi lesquelles une oxydation complète du COD donc une disparition du CODB ;
- Une augmentation du COD entre J0 et J35 de la solution traitée pendant 6 h. La lyse d'une partie des cellules bactériennes et la libération de leur contenu pourrait expliquer

ces résultats. Le processus de production de COD impliquant le COP est à exclure, du fait que la solution filtrée est essentiellement constituée du COD.

Les deux constats peuvent être considérés comme complémentaires : suite au traitement, les changements dans les conditions chimiques offertes aux bactéries par le milieu, le rendent probablement défavorable à leur activité. Il s'en suit une absence de consommation de COD et en aval, une dégradation de l'état physiologique des cellules qui se traduit par une perte progressive de matériel cellulaire (dissous en particulier) vers le milieu qui conduit, à terme, à leur lyse.

Les résultats de la solution filtrée (figure 111 B), montre que seules les valeurs de la solution non traitée se prêtent à un calcul de la concentration en CODB, qui s'élève ici à 0,58 ppm soit 17 % du COD initial (figure 112). Nous ne disposons pas de valeur de référence pour ce type de solution puisque le calcul n'était pas possible sur la base des résultats de l'essai 1. Pour comparaison, la valeur obtenue pour la solution de tryptone qui avait été soumise au même traitement, s'élevait à 2,35 ppm soit 44.2 % du COD initial.

Les concentrations de COD de la solution filtrée non traitée baissent à J30 et à J35. Il est donc possible de calculer les concentrations du CODB de la solution filtrée non traitée (figure 112).

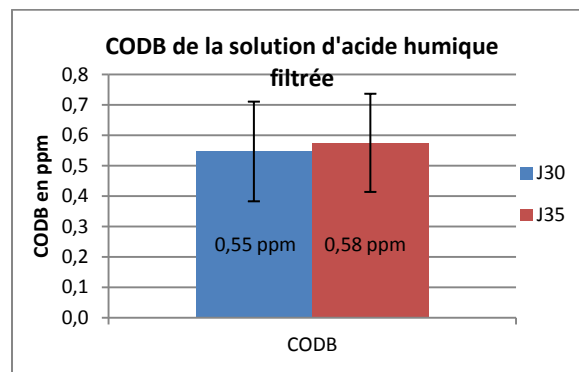


Figure 112 : Concentrations en CODB de la solution d'acides humiques filtrée non traitée à J30 et J35.

Pour toutes les solutions filtrées qui ont été soumises au traitement, par contre, la concentration de COD en fin d'incubation n'est pas statistiquement différente de celle du temps zéro. Le CODB est donc indétectable (ou non mesurable) dans ces solutions traitées. La fraction de CODB de la solution non traitée (référence) ne représente que 17% du COD initial alors que la fraction de COD éliminée par le traitement est de 39, 49, et 68% du COD initial après 1 h, 6 h et 24 h d'exposition au traitement, respectivement. La fraction du CODB (17%) serait donc incluse dans la fraction du COD éliminée par le traitement.

La figure 113 représente une hypothèse de l'action du procédé de traitement sur les différentes fractions du COD : fraction biodégradable (CODB) et fraction réfractaire (CODR).

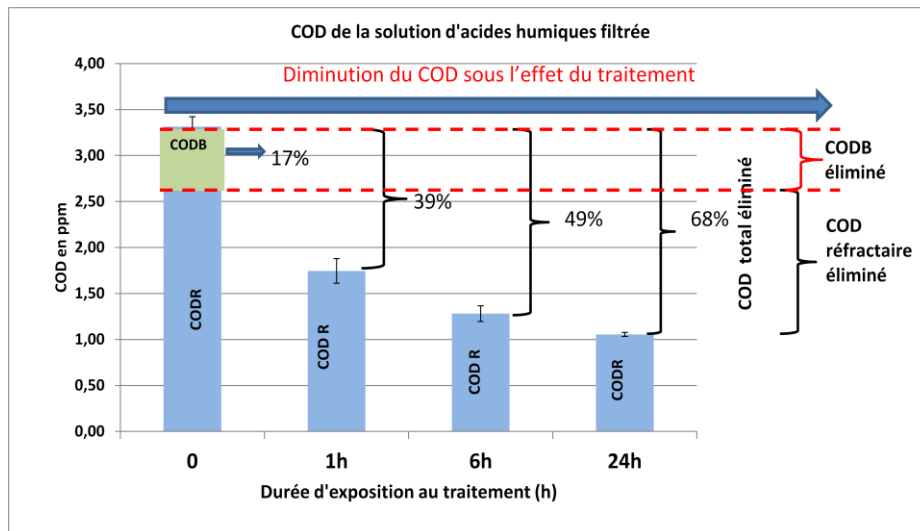


Figure 113 : Schéma représentatif de l'action du traitement H_2O_2/UV sur les fractions biodégradable et réfractaire du COD de la solution d'acides humiques filtrée.

L'hypothèse d'une consommation bactérienne du COD qui serait masquée par une production de COD à partir du carbone particulaire est improbable ici. En effet la solution d'acides humiques filtrée ne comporte pas ou très peu de carbone particulaire. Le COD de cette solution représente en effet $93\% \pm 2,4\%$. Le CODB pourrait donc être éliminé à 100% dès 1 h de traitement.

En conclusion

Les modifications apportées au mode opératoire de la préparation de la solution d'acides humiques ont conduit aux effets attendus. La centrifugation et la filtration ont permis d'éliminer la plus grande partie des particules de carbone organique et par conséquent l'effet du traitement H_2O_2/UV sur le COD et le CODB a pu être visualisé. Ce traitement réduit significativement les concentrations de COD et de CODB de la solution d'acides humiques filtrée, constituée essentiellement de COD et confirme les résultats de l'essai 1.

Ce résultat nous a permis d'envisager un essai plus complet incluant les effets des 3 procédés de traitements (UV, H_2O_2 et H_2O_2/UV) sur des solutions de matières organiques de compositions identiques à celles utilisées lors des traitements des biofilms.

V.2.2.3 Résultats de l'essai 3

Cet essai a été réalisé pour finaliser cette étude en utilisant des solutions de matières organiques de compositions et de concentrations identiques à celles des essais de traitements des biofilms. Les essais précédents ont permis d'apporter des modifications au protocole expérimental permettant de mieux visualiser les effets des traitements sur les solutions de matières organiques. L'objectif principal de ces modifications était de supprimer les particules du carbone organique.

Deux solutions de matière organiques d'une concentration de COD de 3 ppm et composée de 1/3 de tryptone et de 2/3 d'acides humiques ont été utilisées lors de cet essai. La première, désignée « solution standard » a été préparée comme les solutions de matières organiques utilisées pendant les essais de traitement des biofilms. Elle a néanmoins été filtrée après les traitements et avant de recevoir l'inoculum bactérien pour éliminer les particules du carbone organique.

La préparation de la deuxième solution, comporte deux étapes supplémentaires : une centrifugation et une filtration (0,2 µm) de la solution d'acide humique. Cette deuxième solution a été désignée « solution filtrée » en référence à cette première filtration. Elle a également été filtrée (une deuxième fois) après les traitements et avant de recevoir l'inoculum bactérien.

Ces deux solutions ont donc été soumises aux traitements H₂O₂, UV et H₂O₂/UV pendant 6 h et des prélèvements ont été effectués à 1 h et à 6 h de traitement. À la différence des essais 1 et 2, toutes les solutions ont été filtrées à 0,2 µm après les traitements et avant de les ensemercer par la suspension bactérienne.

Précisions

La première et la deuxième filtration ne doivent pas être confondues bien que faites toutes les deux sur filtre de 0,2 µm :

- la première est spécifique à la solution « filtrée » et vise à éliminer les particules de carbone organique avant le traitement de cette solution. La solution standard subit les traitements sans élimination de ces particules.
- la deuxième filtration, commune aux deux solutions, entre dans le mode opératoire de la mesure du CODB. On élimine donc les particules de la solution standard également avant sa mise en incubation avec les bactéries.

Un sous échantillon des solutions de matières organiques a été isolé pour analyse par HPSEC. Les résultats qui suivent sont les moyennes de deux mesures uniquement.

Remarque : cet essai a été répété deux fois, les résultats des deux répétitions aboutissent aux mêmes conclusions.

V.2.2.3.1 Caractérisation des solutions de matières organiques

Les concentrations en COT et COD ainsi que le pourcentage de COD de ces solutions sont présentés dans la figure 114.

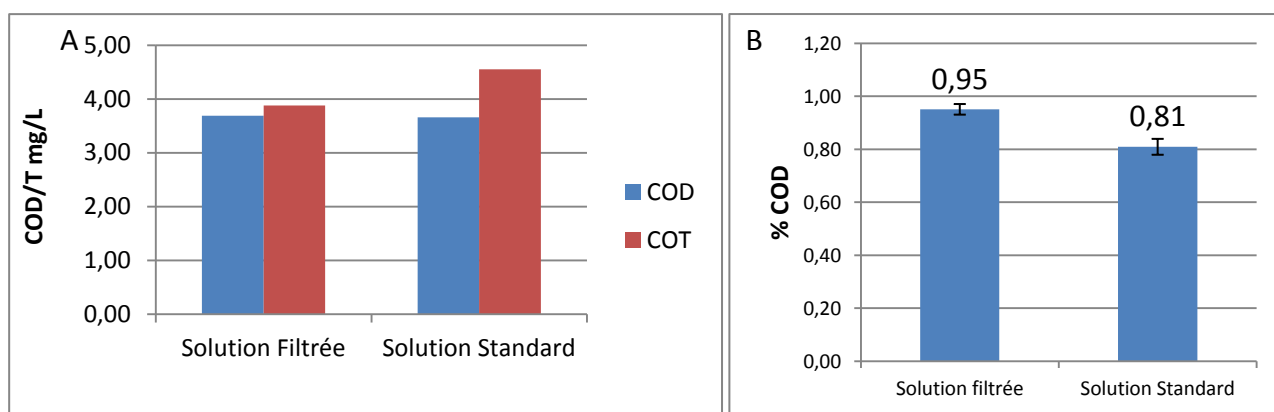


Figure 114 : Concentrations du COD et du COT (A) et pourcentage du COD (B) dans les solutions de matières organiques standard et filtrée.

Les résultats montrent que les étapes supplémentaires de préparation de la solution d'acides humiques, en l'occurrence la centrifugation et la filtration, ont conduit aux effets attendus. En effet, ces deux étapes ont permis d'éliminer l'essentiel du carbone particulaire et d'obtenir un pourcentage de COD de 95 % alors qu'il est que de 81% dans la solution standard. Ce résultat est en

adéquation avec les résultats de l'essai 2 pour lequel le pourcentage du COD était de 93% dans la solution filtrée et de 53% dans la solution standard.

Le pourcentage de COD de la solution standard de l'essai 3 (81%) est significativement supérieur à celui de la solution standard de l'essai 2 (53%). Cette différence est principalement due aux compositions des solutions. La solution standard de l'essai 2 est constituée de 100% d'acide humiques alors que celle de l'essai 3 contient 2/3 d'acides humiques et 1/3 de tryptone, elle-même constituée essentiellement de COD.

V.2.2.3.2 Effet des traitements H₂O₂/UV sur les concentrations en COT et COD

La capacité de l'H₂O₂/UV à l'élimination (minéralisation) du carbone organique est, d'après ces résultats, plus importante que celle des traitements isolés à l'H₂O₂ et aux UV. Cette capacité est également plus importante dans le cas de la solution filtrée qui contient théoriquement peu ou pas de particule (95% de COD).

Tableau 34 : Pourcentages (%) de COD éliminé dans les solutions de matières organiques après 1 h et 6 h d'exposition aux traitements biocides $(1 - \frac{COD_t}{COD_0}) \times 100$ (moyennes et écarts types calculés sur deux mesures)

	Solution Filtrée		Solution Standard	
	1 h	6 h	1 h	6 h
H ₂ O ₂ /UV	25 (8)	48 (2)	15 (1)	34 (1)
UV	8 (1)	20 (1)	7 (2)	11 (1)
H ₂ O ₂	7 (3)	8 (6)	-4 (3)	-2 (8)

*Ecart type

Comme nous l'avons déjà constaté, les pourcentages de COD éliminé sont plus importants sous l'effet de l'H₂O₂/UV. Ces pourcentages sont également plus élevés dans le cas de la solution filtrée. En effet, ils sont de 25% et 48% après 1 h et 6 h de traitement pour cette solution alors qu'ils sont de 15% et 34% après 1 h et 6 h de traitement pour la solution standard. Cette différence pourrait être interprétée par un effet de masque (quenching) de l'irradiation UV exercé par les particules en suspension, plus nombreuses dans la solution standard.

Lorsque les particules de carbone sont présentes, le traitement H₂O₂/UV agit sur elles en les décomposant en molécules de petite taille (production de COD).

Les UV permettent également de réduire les concentrations du COD, cet effet n'est clairement observé qu'après 6 h de traitement. De plus, il est moins important que celui du couple H₂O₂/UV. Afin de conforter cette hypothèse, le pourcentage de COD par rapport au COT a été calculé pour toutes les solutions de matières organiques (tableau 35)

Tableau 35 : Evolution des pourcentages (%) du COD $[100 \times (\frac{COD}{COT})]$ dans les solutions de matières organiques sous l'effet des traitements biocides (moyennes et écarts types calculés sur deux mesures)

	Témoïn (*)	H ₂ O ₂ /UV		UV		H ₂ O ₂	
		1 h	6 h	1 h	6 h	1 h	6 h
solution filtrée	95 (1)	87 (6)	93 (6)	84 (2)	87 (14)	95 (1)	94 (5)
solution Standard	81 (4)	79 (6)	94 (5)	78 (4)	77 (1)	83 (8)	84 (11)

(*) Écarts type

Aucune différence significative n'a été observée entre les solutions filtrées ayant subi les différents traitements, du point de vue du pourcentage de COD.

Le pourcentage de COD dans la solution standard augmente sous l'effet du traitement H₂O₂/UV (à 6 h) alors qu'il ne varie pas sous l'effet des UV et de l'H₂O₂ appliqués isolément.

Les variations des pourcentages du COD sous l'effet de l'H₂O₂/UV dans la solution standard confirment l'hypothèse d'une production de COD à partir du carbone particulaire.

En conclusion

Les résultats de cet essai confortent les résultats des essais précédents à propos des points suivants :

- 1- seul le traitement H₂O₂/UV permet de réduire significativement les concentrations du carbone organique.
- 2- cet effet est plus marqué pour la solution filtrée (théoriquement dépourvue de particules)
- 3- dans la solution standard le pourcentage de COD augmente sous l'effet du couple H₂O₂/UV

En plus de son effet quantitatif, l'H₂O₂/UV a un effet qualitatif puisqu'il augmente le pourcentage du COD par oxydation partielle du COP.

La performance du couple H₂O₂/UV est proportionnelle à la durée d'application du traitement et donc à la quantité des radicaux OH[•] qu'il produit.

V.2.2.3.3 Effet du traitement H₂O₂/U, UV et H₂O₂ sur les concentrations en CODB

Les solutions de matières organiques, standard et filtrée et non traitée, ont été filtrées à l'aide d'un filtre de polycarbonate de 0,2 µm. Elles ont ensuite étéensemencées par une suspension de bactéries environnementales puis incubées sous agitation et à température ambiante pendant 30j.

Les concentrations du CODB dans les différentes solutions de matières organiques sont présentées dans le tableau 36.

Tableau 36 : Concentration de CODB (ppm) dans les solutions de matières organiques exposées aux traitements biocides pendant 1 h et 6 h et incubées pendant 35 jours en présence d'une suspension bactéries environnementales. Le CODB est calculé selon l'équation $CODB = COD_{t0} - COD_{t30j}$

mg/L	Témoin	H ₂ O ₂ /UV		UV		H ₂ O ₂	
		1 h	6 h	1 h	6 h	1 h	6 h
Solution filtrée	1,07 (0,05)*	0,55 (0,15)	0,24 (0,19)	1,04 (0,26)	0,84 (0,08)	0,93 (0,26)	1,04 (0,08)
Solution standard	0,95 (0,02)	0,80 (0,05)	0,25 (0,05)	1,10 (0,07)	0,92 (0,32)	1,14 (0,08)	0,99 (0,19)

(*) Écart type de deux mesures

Globalement les résultats sont en adéquation avec les résultats précédents et montrent que seul le traitement H₂O₂/UV permet de réduire significativement les concentrations du CODB des deux solutions. Nous retrouvons ici le constat précédent concernant le COD, selon lequel l'effet du traitement est plus marqué sur la solution filtrée ce qui met de nouveau l'accent sur le rôle des particules de carbone organique.

Ceci renforce l'hypothèse d'une production de COD (et probablement de CODB) à partir des particules sous l'effet du traitement, constat renforcé par l'augmentation du pourcentage de COD dans la solution standard sous l'effet du couple H₂O₂/UV (tableau 35).

L'H₂O₂ ou l'UV seul n'ont pas d'effet sur les concentrations du CODB des deux solutions de matières organiques. En effet aucune différence significative n'a été observée entre les concentrations de CODB des solutions traitées à l'H₂O₂ et aux UV et les solutions témoins.

Le tableau 37 présente les pourcentages du CODB dans les différentes solutions de matières organiques sous l'effet des traitements.

Tableau 37 : Pourcentage de CODB (CODB/COD) dans les solutions de matière organiques (moyennes de 2 mesures)

	Témoin	H2O2/UV		UV		H2O2	
		1 h	6 h	1 h	6 h	1 h	6 h
Solution filtrée	32 (1)*	3 (3)	22 (1)	31 (7)	28 (2)	27 (2)	32 (8)
Solution standard	29(1)	28 (1)	31 (9)	37 (3)	31 (11)	33 (2)	29 (8)

()* Ecart type

Ces résultats montrent :

- 1- qu'après 1 h d'application du couple H₂O₂/UV, la proportion du CODB reste stable dans la solution standard et diminue légèrement dans la solution filtrée. Après 6 h d'application, ce pourcentage diminue significativement dans la solution filtrée et reste stable dans la solution standard. Le résultat obtenu avec la solution filtrée rejoint le résultat obtenu avec la solution de tryptone (essai 1), toutes les deux supposées dépourvues de particules.
- 2- après 1 h d'application, le pourcentage de CODB augmente dans la solution standard sous l'effet des UV. Ce résultat peut être rapproché à la présence de particules et de la dégradation partielle du carbone organique par les radiations UV produisant ainsi des molécules plus petites.

Malgré l'absence d'effet quantitatif, les UV auraient donc un effet qualitatif sur la composition du carbone organique. Ce résultat est par ailleurs confirmé par les résultats de l'analyse HPSEC (cf. résultats suivant).

V.2.2.3.4 Caractérisation des solutions de matières organiques après traitement (UV, H₂O₂ et H₂O₂/UV) par analyse HPSEC

La chromatographie d'exclusion stérique est une méthode de fractionnement des molécules organiques sur la base de paramètres physiques, notamment le poids moléculaire et la structure moléculaire.

V.2.2.3.4.1 Caractérisation des solutions non traitées

Les résultats de la caractérisation des solutions de matières organiques témoins par HPSEC-UV-Fluo montrent une étroite ressemblance entre les profils des solutions standard et filtrée. Nous avons donc choisi de présenter les résultats de la caractérisation d'une seule solution, en l'occurrence la solution standard (figure 115).

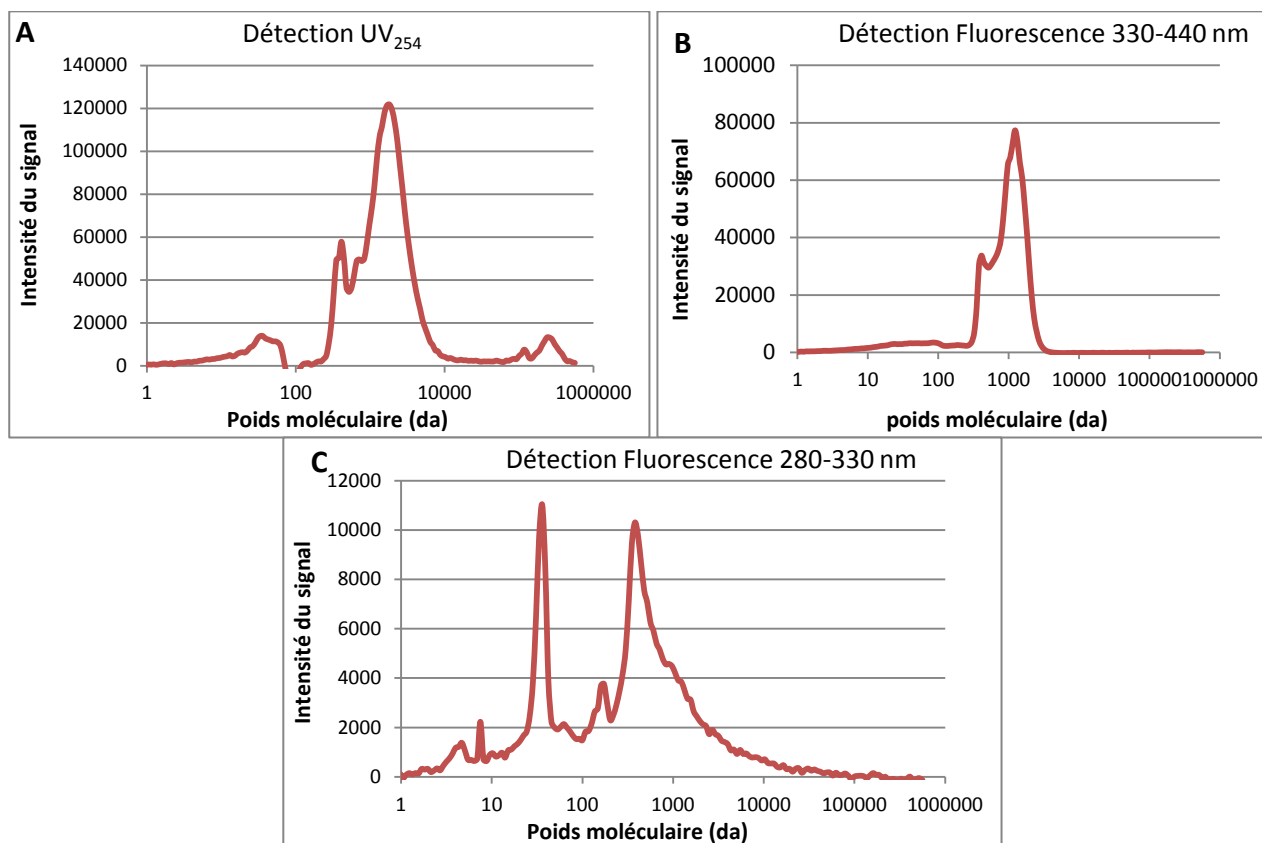


Figure 115 : Profils moléculaires de la solution standard de matières organiques non traitée. (A) spectre UV à 254 nm, (B) spectre de fluorescence Ex330-Em440 nm et (C) Ex280-Em330 nm.

Globalement, les profils moléculaires des deux solutions (standard et filtrée) obtenus sous l'effet des traitements appliqués sont également similaires, nous avons donc choisi de présenter dans les paragraphes suivants les résultats de la solution standard.

V.2.2.3.4.2 Effet du traitement par irradiation UV

Les résultats de la caractérisation moléculaire par HPSEC des solutions de matières organiques traitées par les radiations UV en comparaison avec la solution non traitée sont présentés dans la figure 116. Quels que soient les profils moléculaires considérés, les spectres font apparaître des changements de la composition des solutions après 6 h de traitement qui se traduit par un décalage des courbes vers la gauche (Courbes vertes, figure 116 A, B et C). Ce décalage est témoin d'une baisse du poids moléculaire et d'un changement de la structure des molécules. L'intensité du signal reste néanmoins inchangée.

On observe également la disparition de certains pics et l'apparition d'autres (figure 116 C). Sous réserve d'une confirmation par l'analyse individuelle de ces pics, ce résultat suppose la production de molécule de petites tailles. Ce résultat rejoint le constat observé précédemment qui suppose un effet qualitatif des UV mis en évidence par l'augmentation du pourcentage du CODB (essai 3) sous l'effet de ce traitement.

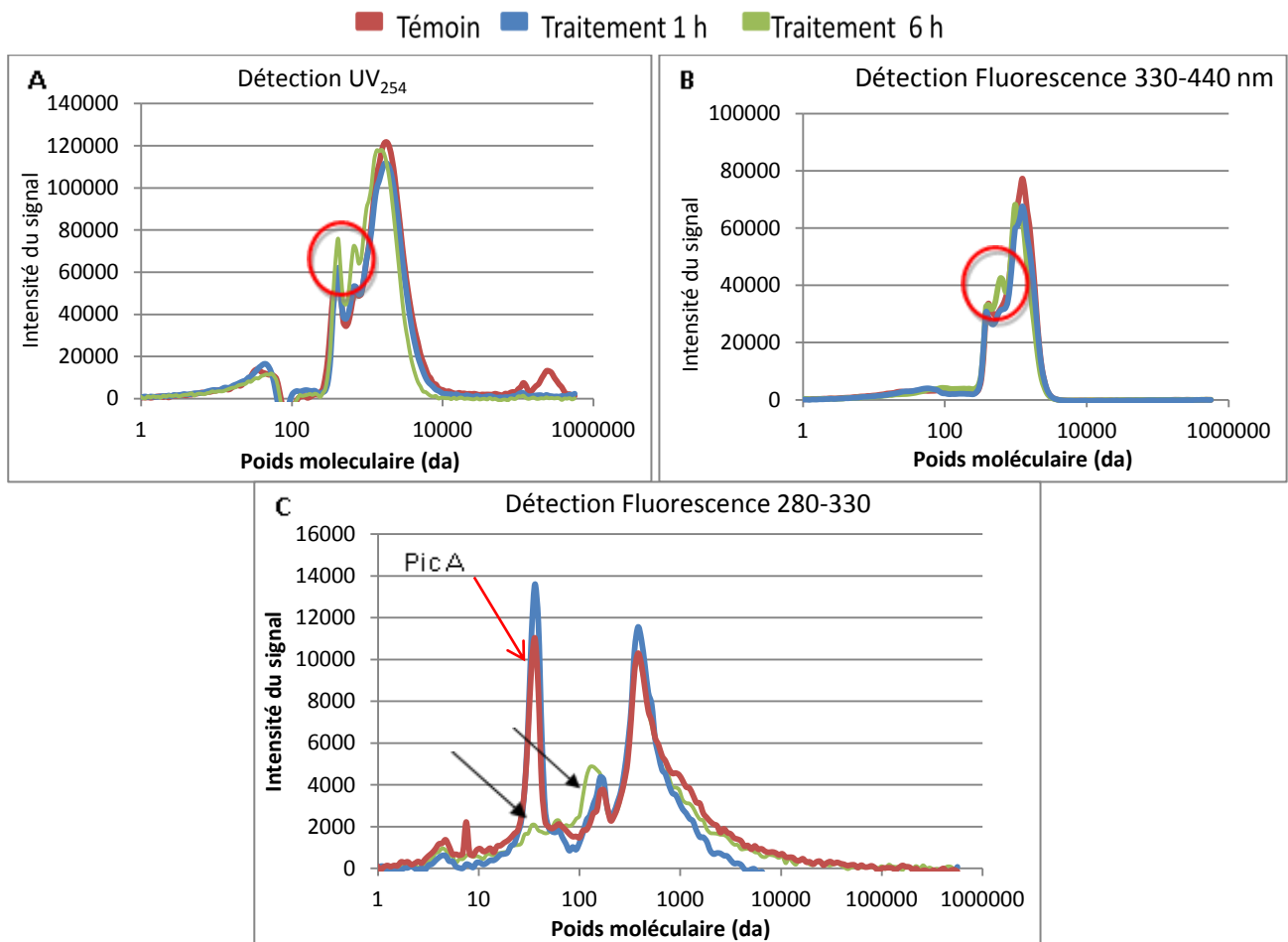


Figure 116 : Profils moléculaires des solutions de matières organiques (courbes rouges : solution témoin, courbes bleues : solution traitée pendant 1h, courbes vertes : solutions traitées pendant 6h), (A) : spectre UV (254 nm), (B) : spectre de fluorescence Ex330-Em440 nm et (C) Ex280-Em330 nm.

V.2.2.3.4.3 Effet du traitement H₂O₂

Les résultats de la caractérisation moléculaire par HPSEC des solutions de matières organiques traitées par l'H₂O₂ seul par comparaison avec les solutions non traitées sont présentés dans la figure 117.

Les spectres présentés dans cette figure ne font apparaître aucun changement des profils moléculaires sous l'effet du traitement H₂O₂. Ce résultat confirme l'absence d'effet qualitatif de ce traitement auquel s'ajoute l'absence d'effet quantitatif (démonstré précédemment par les mesure de COD et du CODB). Le traitement H₂O₂ seul n'a pas eu d'effet, à la concentration testée, sur les poids moléculaires ni sur la structure des molécules organiques.

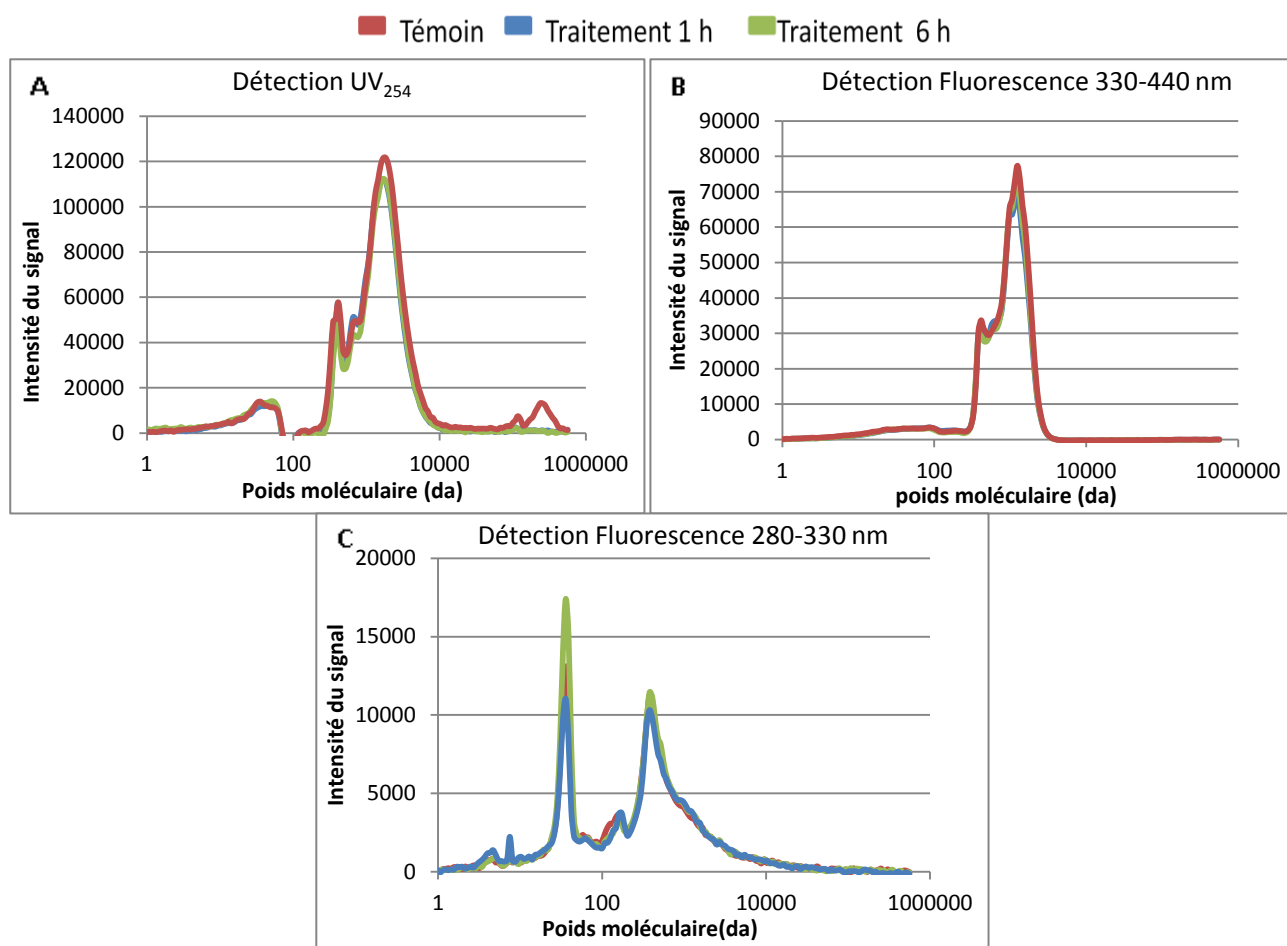


Figure 117 : Profils moléculaires des solutions de matières organiques (courbes rouges : solution témoin, courbes bleues : solution traitée pendant 1h, courbes vertes : solutions traitées pendant 6h), (A) :spectre UV (254 nm), (B) : spectre de fluorescence Ex330-Em440 nm et (C) Ex280-Em330 nm.

V.2.2.3.4.4 Effet du couplage H_2O_2/UV

Les résultats de la caractérisation moléculaire par HPSEC des solutions de matières organiques traitées par l' H_2O_2/UV par comparaison avec les solutions non traitées sont présentés dans la figure 118. Cette figure montre un changement complet des profils moléculaires des solutions de matières organiques sous l'effet du traitement H_2O_2/UV . Cet effet est beaucoup plus marqué que celui des UV et concorde avec l'effet quantitatif précédemment mis en évidence (par mesure de COD et du CODB). Cet effet se traduit par une baisse drastique du niveau des signaux et par un décalage progressif des spectres vers la gauche, donc une baisse des poids moléculaires des molécules détectées, pour aboutir à des profils très différents de ceux des solutions témoins.

Dans le cas du spectre UV (figure 118 A), on observe l'apparition d'un nouveau pic, résultant probablement de la genèse de nouvelles molécules organiques suite à la dégradation des molécules de plus grande taille initialement présentes dans la solution.

Le spectre de fluorescence à Ex330-Em440 nm montre, une baisse d'amplitude des pics (figure 118 B), alors que celui de la fluorescence à Ex280-Em330 montre une disparition de certains pics (figure 118 C, flèches). Le pic désigné par « pic A », par exemple, a complètement disparu sous l'effet du couplage dès 1 h de traitement alors que sous l'effet du traitement UV on observe une baisse d'amplitude de ce même pic qu'après 6 h de traitement (figure 116 C). Ce résultats montre une performance élevée du couplage en relation avec la présence des radicaux OH^\bullet générés par la catalyse accélérée de l' H_2O_2 sous l'effet des radiations UV.

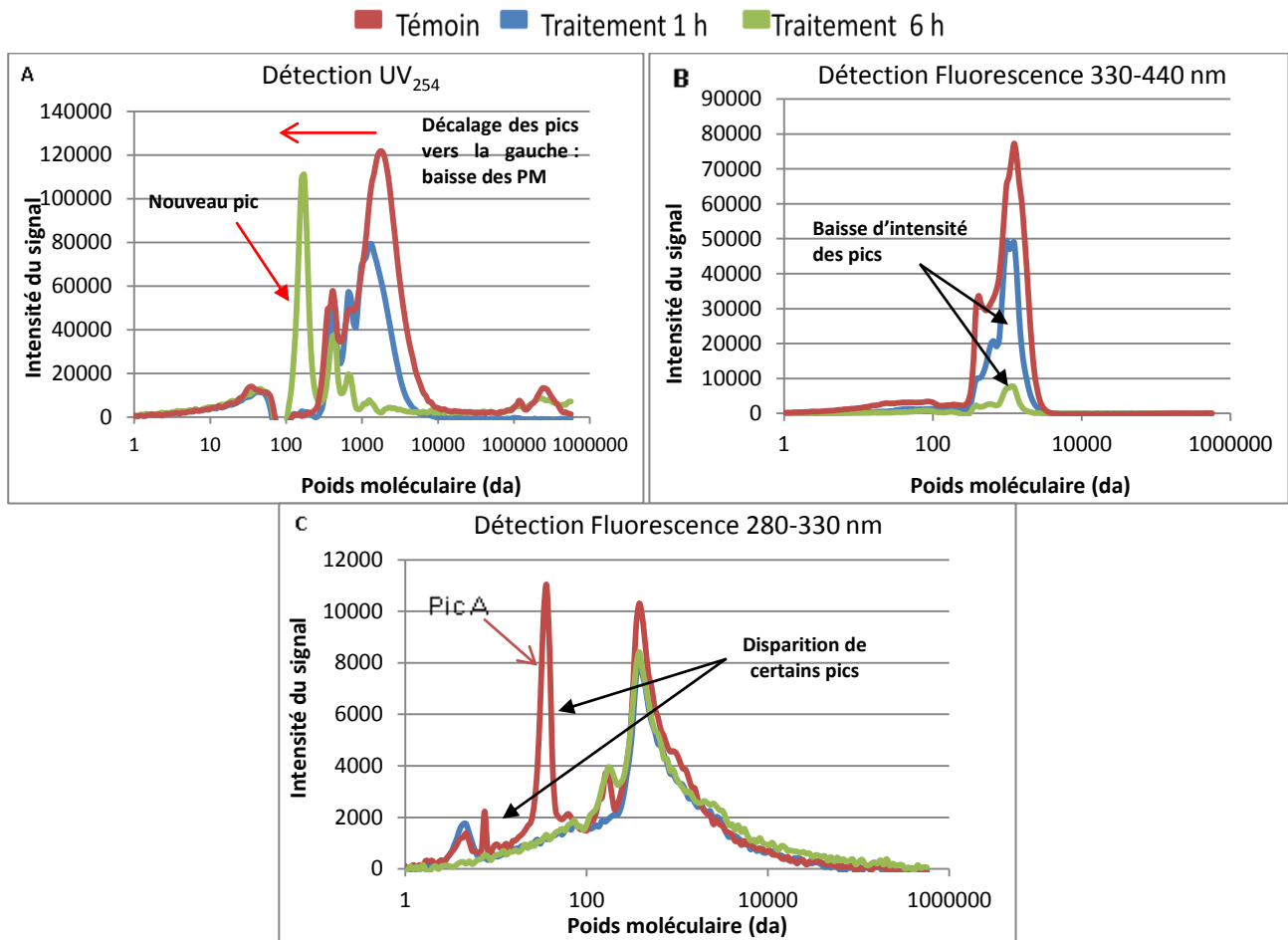


Figure 118 : Profils moléculaires des solutions de matières organiques (courbes rouges : solution témoin, courbes bleues : solution traitée pendant 1h, courbes vertes : solutions traitées pendant 6h), (A) : spectre UV (254 nm), (B) : spectre de fluorescence Ex330-Em440 nm et (C) Ex280-Em330 nm.

Ce résultat concorde avec l'effet quantitatif de ce traitement aboutissant à la réduction significative des concentrations de COD et de CODB. La détection UV suggère donc la production de molécules de faible poids moléculaire qui serait biodégradables. Néanmoins en terme de quantité, nous avons mis en évidence qu'il aboutit aussi à une réduction des concentrations de CODB et agit donc en affaiblissant les microorganismes.

Nos résultats sont en adéquation avec les résultats de Sarathy *et al.* (2007 ; 2009) qui montrent que le traitement associant l' H_2O_2 à 20 ppm et un flux UV (fluence) de 1500 mJ/cm^2 , induit un changement du profil moléculaire des solutions de matières organiques traitées. Ils montrent que l'oxydation partielle des matières organiques aboutit à l'ouverture du noyau des structures aromatiques, la perte de l'aromaticité des molécules de poids moléculaires élevés et le clivage des structures carbonées à double liaison. Dès lors que la dégradation des molécules organiques est partielle, les structures moléculaires complexes sont ouvertes et les molécules organiques sont fragmentées en plus petites molécules.

Wang *et al.*, (2006) ont également montré l'oxydation des substances humique et non humique sous l'effet de ce traitement, aboutissant à une oxydation partielle ou complète selon les doses d'UV et d' H_2O_2 appliquées. Leurs résultats montrent un changement des profils moléculaires (en termes de PM) des solutions traitées, avec toutefois une meilleure efficacité du couplage H_2O_2 /UV par rapport aux UV seul.

Dans les conditions appliquées lors de nos essais, il n'est pas anodin d'obtenir ces résultats et d'aboutir à des effets plus marqués du fait de l'intensité du traitement, plus élevée que celle appliquée par Sarathy *et al.* (2007 ; 2009) (50 ppm d'H₂O₂ et plus de 13000 mJ/cm² de fluence UV après 6 h de traitement).

V.2.2.3.5 Cytotoxicité des solutions de matières organiques traitées

La cytotoxicité des solutions de matières organiques traitées et non traitées de l'essai 3 a été mesurée vis-à-vis de la bactérie *V.fischeri*. Cette mesure a été effectuée afin de mettre en évidence la production d'éventuels composés toxiques du fait de la décomposition de la matière organique sous l'effet des différents traitements. Nous avons en effet émis l'hypothèse de la production de molécules toxiques secondaires capables de diffuser et d'atteindre les biofilms et qui pourraient expliquer en partie la performance élevée du couple H₂O₂/UV observée lors des traitements des biofilms. Les résultats sont présentés dans la figure 119.

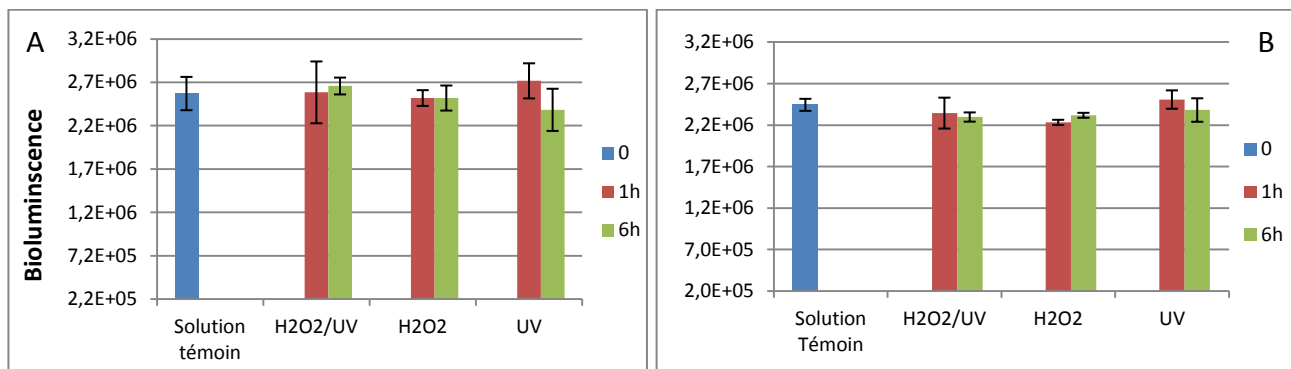


Figure 119 : Bioluminescence de *V.fischeri* incubée pendant 15 min dans des solutions de matière organique non traitées et traitée par l'H₂O₂ et par les UV appliqués isolément et par le couple H₂O₂/UV,. A : solutions filtrées, B : solutions standards.

Ces résultats ne montrent pas d'effet toxique des solutions de matières organiques traitées vis-à-vis de *V. fischeri* dans les conditions de l'expérimentation. La bioluminescence de *V. fischeri* obtenus avec les solutions de matières organiques traitées n'était pas significativement différente de celle obtenue avec les solutions témoins. Ce résultat, obtenu lors de deux essais indépendants, n'exclut pas pour autant l'éventualité de la production de molécules toxiques du fait de la durée d'application de 6 h, une durée qui est très faible en comparaison avec celles utilisées dans nos essais de traitement des biofilms en laboratoire. Les quantités qui seraient produites après 6 h d'exposition pourraient être trop faibles pour avoir un effet toxique significatif.

Très peu de données bibliographiques sont disponibles sur l'écotoxicité d'éventuels sous produits générés par le couple H₂O₂/UV. Cabiscol *et al.* (2000) indiquent néanmoins que la peroxydation des lipides et la dégradation des acides gras polyinsaturés par ce traitement aboutissent à la formation des molécules réactives telles que les aldéhydes. Ces derniers sont très réactifs, relativement stables et peuvent endommager les protéines.

V.3 Discussion

L'analyse de ces résultats montre que certains traitements étudiés permettent de réduire significativement les concentrations des principaux indicateurs analysés. Les traitements par le couple H₂O₂/UV à 30 et à 50 ppm d'H₂O₂ permettent en effet de réduire significativement les concentrations de l'ATP, des bactéries cultivables et des bactéries totales. La stabilité des concentrations de ces paramètres dans les biofilms non traités à des valeurs significativement supérieures à celles des biofilms traités permet d'attribuer cette réduction à l'effet des traitements appliqués. Le couple H₂O₂/UV s'est donc révélé le plus performant des traitements étudiés et cette performance est proportionnelle à la concentration de l'H₂O₂.

L'effet de ce traitement sur les bactéries totales n'apparaît pas dès le début de son application comme cela a été constaté pour l'ATP et les bactéries cultivables. En effet, la diminution des concentrations des bactéries totales lors du couplage H₂O₂/UV est amorcée à partir de 96 h et 72 h de traitement à 30 et à 50 ppm d'H₂O₂ respectivement. Cette évolution lente est due à la spécificité de la technique de comptage des bactéries totales qui prend en compte toutes les formes des bactéries : cultivables (donc actives), viables mais non cultivables (VBNC) et mortes. Pour que les concentrations des bactéries totales diminuent il faut que les cellules bactériennes soient entièrement détruites et que leurs composants, dont l'ADN, qui est la cible du marquage du DAPI, soient dilués dans le milieu. Dans les conditions de nos essais, cette action est plus tardive. Ce traitement agit d'abord sur l'activité métabolique et sur la cultivabilité des bactéries avant d'agir sur leur intégrité membranaire.

Le traitement à l'H₂O₂ aboutit à une performance transitoire, également proportionnelle à la concentration d'H₂O₂ appliquée. Cette performance est néanmoins inférieure à celle du couple H₂O₂/UV. La comparaison de la performance du couple H₂O₂/UV et de l'H₂O₂ seul au cours des premières 24 h de traitement montre que celle de l'H₂O₂ est acceptable et représente en effet 80% et 60% de celle du couplage vis-à-vis de l'ATP et des bactéries cultivables, respectivement. Mais pour les concentrations d'H₂O₂ testées nous avons observé l'apparition d'un phénomène de reviviscence qui aboutit à l'augmentation des concentrations des bactéries cultivables et dans une faible mesure de l'ATP. La reviviscence observée lors de ce traitement est plus tardive à 50 ppm, ce phénomène serait donc retardé à forte dose d'H₂O₂.

Cette reviviscence s'accompagne de l'augmentation des pourcentages des bactéries cultivables possédant une activité catalase et d'une surconsommation de l'H₂O₂. En effet, les bactéries cultivables possédant l'activité catalase deviennent majoritaires et représentent environ 60 % des bactéries cultivables totales (données obtenues lors de deux essais indépendants réalisés à la même concentration d'H₂O₂).

La reviviscence est due à l'adaptation des communautés microbiennes à l'action de l'H₂O₂. Cette adaptation serait donc la conséquence d'une pression de sélection exercée par l'H₂O₂ qui aboutit à la persistance des bactéries possédant une activité catalase nécessaire au contournement de l'action de l'H₂O₂. L'action de ce traitement conduit donc au changement de la structure et de la composition de la communauté microbienne du biofilm en favorisant le groupe bactérien le plus résistant à l'action du biocide. Nos résultats montrent également un changement de la communauté des bactéries cultivables du biofilm suite au traitement à l'H₂O₂. Ils sont en accord avec plusieurs études antérieures. En effet, Roeder *et al.* (2010) ont étudié par une méthode d'empreinte moléculaire (DGGE), l'effet de certains désinfectants sur la composition des communautés microbiennes des biofilms traités. Cette étude montre particulièrement que l'application d'H₂O₂ aboutit à un changement de la composition et à l'augmentation de la diversité

de la communauté microbienne du biofilm sous l'effet de la désinfection. Cet effet dépend néanmoins de la concentration d' H_2O_2 appliquée et des additifs de désinfection utilisés. D'autres études montrent également l'impact des processus de désinfection, notamment des UV et du chlore, sur la composition des communautés microbiennes du biofilm (Emtiazi *et al.*, 2004 ; Eichler *et al.*, 2006). Pozos *et al.* (2004) ont cependant trouvé un résultat contradictoire au sujet des UV qui, selon eux, n'ont pas d'effet sur la composition des communautés microbiennes du biofilm. Ces différences pourraient s'expliquer par la divergence des démarches expérimentales suivies dans les deux études et par la spécificité des techniques d'investigation.

Cette pression de sélection exercée par l'action des biocides favorise les bactéries persistantes et les microorganismes les mieux adaptés à l'action du biocide utilisé, dans notre cas les bactéries catalase +. Ces communautés microbiennes dites « persisters » utilisent entre autre les débris organiques des cellules lysées par le traitement et la matière organique disponible dans le milieu pour survivre, d'où les phénomènes de reviviscence observés après les processus de désinfection. Lors de notre étude, le traitement à l' H_2O_2 à 50 ppm aboutit à une performance initiale et à une reviviscence plus importante que celles observée à 30 ppm. La reviviscence semble donc proportionnelle à l'importance de l'effet biocide. Ceci pourrait s'expliquer par la formation plus importante de débris cellulaires et donc d'une épargne des nutriments accrue dont la quantité est également proportionnelle à l'effet du traitement appliqué. Les débris organiques et les nutriments épargnés seraient donc disponibles pour les cellules résiduelles et favoriseraient par conséquent leur reviviscence. Le suivi des concentrations de la matière organique lors de ces traitements montre effectivement l'accumulation du COT et du COD sous l'effet de l' H_2O_2 seul, formant ainsi une épargne nutritionnelle qui a donc favorisé la reviviscence des bactéries résiduelles les mieux adaptées au stress oxydatif.

Nous n'avons pas fait une étude plus précise du phénomène d'adaptation puisque l'objectif de nos essais était d'adapter ce traitement aux conditions réelles des tours aéroréfrigérantes. Cette constatation est cependant importante puisqu'elle nous a permis d'orienter nos essais et de mettre en évidence le fait que ces concentrations d' H_2O_2 ne sont pas optimales dans le traitement des biofilms. L'application d' H_2O_2 à 30 et à 50 ppm, couplé aux UV permet de prévenir ce phénomène d'adaptation et de s'affranchir de la reviviscence, mais ce traitement ne permet pas d'éradiquer entièrement les biofilms. L'arrêt de ce traitement pourrait également induire la reviviscence des biofilms, mais l'oxydation de la matière organique par le couplage (diminution des concentrations du COD et du COT) serait une entrave à cette reviviscence.

Cette étude a montré que l'efficacité du couplage dépend, en premier lieu, de la vitesse de production des radicaux hydroxyles. Un faible niveau de ces radicaux semble induire une adaptation, même en présence des UV comme cela a été le cas lors du couplage H_2O_2 (10 ppm)/UV. Une fois l'adaptation installée l'augmentation du flux, même à des niveaux similaires à ceux appliqués lors des traitements les plus efficaces (30 et 50 ppm d' H_2O_2 couplé aux UV), n'a pas permis de rétablir la performance du traitement. Cette étude met également l'accent sur l'importance de la dose initiale injectée. Cette dose doit être suffisamment létale pour éviter tout développement d'une adaptation microbienne.

Au cours des expériences réalisées dans le cadre de cette étude, la détection des *L. pneumophila* cultivables n'a pas toujours été possible. Malgré sa présence dans les biofilms (détectée par immunofluorescence), la concentration des formes cultivables de *L. pneumophila* est très faible et dépasse rarement 10 UFC/cm². Dans certains essais, les *L. pneumophila* cultivables

n'ont jamais été détectées dans les biofilms traités et non traités. Néanmoins, durant le traitement à l'H₂O₂ à 50 ppm couplé aux UV, les *L. pneumophila* cultivables deviennent indétectables dans les biofilms traités dès 24 h, alors qu'elles se maintiennent à une concentration de 1 Log/cm² dans les biofilms non traités.

La disparition des formes cultivables de *L. pneumophila* dans les biofilms après leur transfert dans les conditions de laboratoire pourrait s'expliquer par le changement des conditions environnementales notamment en termes de température. Les études de l'adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire ont montré que la charge microbienne totale des biofilms diminue après ce transfert. De plus, la concentration de *L. pneumophila* cultivables dans les biofilms développés sur les lames de verre dans la source « Soufre » est très faible et représente moins d'un Log (résultats de plusieurs mesures effectuées au laboratoire). La détection des *L. pneumophila* totales par immunofluorescence dans les biofilms montre qu'elles subsistent tout de même dans les biofilms après le transfert mais sous d'autres formes, notamment sous la forme VBNC ou morte. La détection des *L. pneumophila* totales a été réalisée par immunofluorescence, cette technique, est beaucoup plus sensible que la méthode culture dépendante, mais surestime le risque *L. pneumophila*. Elle a permis néanmoins d'étudier l'effet des traitements biocides testés sur cette bactérie. Seuls les traitements H₂O₂ seul à 50 ppm et les traitements H₂O₂ à 30 et 50 ppm couplé aux UV aboutissent à une diminution significative des concentrations de *L. pneumophila* totales dans les biofilms traités. Malgré cet effet significatif, ces bactéries se maintiennent dans les biofilms traités à 50 ppm d'H₂O₂ seul et, par le couple H₂O₂ à 30 ppm-UV (lors de la 1^{ère} expérience). Elles deviennent indétectables uniquement avec le couplage H₂O₂ à 50 ppm-UV et lors de la 2^{ème} expérience à 30 ppm-UV.

Les faibles concentrations des amibes et les incertitudes de la technique qui a servi à les dénombrer ne permettent pas de conclure avec certitude sur les effets des traitements sur leur survie. Néanmoins le traitement H₂O₂/UV à 50 et à 30 ppm d'H₂O₂ ont permis de réduire significativement leurs concentrations. Ceci pourrait expliquer aussi en partie les résultats de l'analyse de *L. pneumophila* qui se protègent de l'action des biocides par un mode de vie intra amibien. L'absence de l'hôte ou la diminution de ses concentrations peuvent aboutir à la diminution du nombre de *L. pneumophila* alors directement exposée aux biocides.

Les mécanismes d'action de ce traitement vis-à-vis des amibes peuvent être de plusieurs ordres : action directe par son effet biocide, ou action indirecte, par privation nutritionnelle suite à la destruction des cellules bactériennes qui constituent leur source principale de nutriments. A ce niveau de nos investigations, nous ne pouvons pas conforter l'un ou l'autre de ces mécanismes. Aucune étude n'a pour le moment été effectuée pour étudier l'effet biocide proprement dit de ces traitements vis-à-vis des amibes.

Il apparaît donc que la performance du traitement H₂O₂/UV à 50 ppm d'H₂O₂, vis à vis des indicateurs spécifiques, comme pour les autres indicateurs, est supérieure à celle des autres traitements.

L'étude de l'effet des biocides sur les légionelles dans les biofilms devrait être généralisée. Plusieurs études montrent en effet que 98% des légionelles, dont *L. pneumophila* sont isolées à partir des surfaces des canalisations donc des biofilms (Saby *et al.*, 2005). La persistance des *L. pneumophila* et d'autres bactéries (totales) dans les biofilms lors de notre étude, même pendant l'application d'un procédé efficace, n'est pas un fait rare. En effet, plusieurs études montrent la persistance des bactéries, notamment des *L. pneumophila*, après les processus de désinfection (Cooper *et al.*, 2008 ; Kilb *et al.*, 2003). Le chlore est un biocide largement utilisé et décrit comme efficace vis-à-vis de *L. pneumophila* (Kilb *et al.*, 2003), néanmoins Cooper *et al.* (2008) ont montré

que *L. pneumophila* persiste aussi dans les biofilms après une exposition à une forte dose de chlore. Saby *et al.* (2005) montrent également que le chlore et le peroxyde d'hydrogène ne suffisent pas à éliminer entièrement *L. pneumophila*. D'autres études ont montré que *L. pneumophila* entre dans un état VBNC sous l'effet des traitements biocides notamment le traitement thermique à 55 °C (Chang *et al.*, 2007) et la chloration (Turetgen *et al.*, 2008) et que ces formes VBNC deviennent plus résistantes à l'action du chlore. Notre étude est en accord avec ces résultats ; en effet, les traitements appliqués n'aboutissent pas à une élimination totale des biofilms.

L'adaptation au stress oxydatif par l'activité catalase explique la persistance des bactéries et la reviviscence observée suite au traitement à l'H₂O₂. *L. pneumophila* possède deux gènes de catalase *katA* et *KatB*. Ces deux enzymes sont localisées dans deux compartiments distincts, en effet *KatA* est localisée dans le périplasme et *KatB* dans le cytoplasme. Quelle que soit leur localisation cellulaire, ces deux enzymes jouent un rôle important dans la virulence de *L. pneumophila* mais elles ne sont pas induites par de l'H₂O₂ exogène. Bien que plusieurs études indiquent que *L. pneumophila* est exposée à l'H₂O₂ et /ou d'autres espèces réactives de l'oxygène au cours de la phagocytose, elle ne développe pas de réponse adaptative vis-à-vis de l'H₂O₂ exogène (Bandyopadhyay *et al.*, 1998 ; 2000 ; 2003). *L. pneumophila* ne serait donc pas impliqué dans l'adaptation à l'H₂O₂ observée lors des traitements à l'H₂O₂ seul. Cette adaptation serait plutôt due à d'autres espèces bactériennes plus résistantes, capables de mettre en œuvre une réponse adaptative au stress oxydatif par le biais d'enzymes spécifiques de la détoxification.

Malgré la reviviscence observée et l'augmentation des concentrations de bactéries cultivables au cours des traitements à l'H₂O₂, aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'a été détectée. Cette bactérie persiste sous d'autres formes (VBNC ou morte) dans les biofilms après un traitement à l'H₂O₂. Cette persistance serait due à d'autres mécanismes de résistance liés au mode de vie sessile dans le biofilm et/ou intra amibien. Les légionelles pourraient bénéficier de l'activité catalase d'autres bactéries qui décomposent et limitent la pénétration de l'H₂O₂ dans le biofilm et protégerait ainsi les bactéries situées dans les couches inférieures du biofilm. De plus, le mode de vie intra amibien confère aux légionelles une meilleure résistance à l'action des biocides. Ces interactions et ce mutualisme est à la base de la formation du biofilm qui permet à l'ensemble des communautés microbiennes diverses qui le constituent de bénéficier des avantages procurés par ce mode de vie et des capacités métaboliques spécifiques de certaines communautés microbiennes.

Il est donc important de prendre en considération ces éléments expérimentaux et bibliographiques pour la mise au point de traitements biocides notamment vis-à-vis des légionelles dont l'écologie et le mode de vie intra amibien sont des facteurs de résistance à l'action des biocides. Le traitement H₂O₂/UV a permis d'aboutir à des performances élevées notamment en prévenant la reviviscence bactérienne. Ce couplage présente donc un réel intérêt pour des applications industrielles.

Effet des traitements H₂O₂, UV et H₂O₂/UV sur les concentrations de matières organiques

Beaucoup d'importance est accordée à la présence de la matière organique naturelle dans les réseaux de distribution d'eau. Certains produits de désinfection réagissent avec cette matière organique et produisent des sous produits de désinfection dont la toxicité est mal connue (désinfection by-products, DBPs). Les principaux biocides qui génèrent des DBPs sont le chlore, la chloramine et l'ozone (Goslan *et al.*, 2009). Par ailleurs, la présence de la matière organique sous une forme biodégradable pourrait être à l'origine de phénomènes de reviviscences bactériennes, notamment en présence de faibles concentrations de résidus de produits désinfectants. Ce

phénomène pourrait s'avérer à l'origine de risques sanitaires considérables notamment pour l'eau de consommation mais aussi en liaison avec des activités industrielles (industrie agroalimentaire, tours aéroréfrigérantes...).

Les résultats du suivi des concentrations de la matière organique au cours des traitements des biofilms montrent que seul le couplage permet de réduire significativement les concentrations du COD et du COT de façon proportionnelle à la concentration en H_2O_2 . L'application des UV seuls et de l' H_2O_2 seul ne réduit pas les concentrations de la matière organique mais aboutit plutôt à l'augmentation des proportions de COD par la décomposition du COT. Cet effet pourrait stimuler la croissance des biofilms. La décomposition totale de la matière organique par le couple H_2O_2 /UV conduit au contraire à la privation des biofilms de sources de carbone, ce qui, à terme, participe à leur destruction.

Cet effet indirect du couple H_2O_2 /UV s'ajoute à son effet biocide proprement dit et augmente ainsi sa performance vis-à-vis des biofilms. Son impact sur les nutriments peut expliquer en partie sa capacité à prévenir l'adaptation au stress oxydatif.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de 3 traitements biocides : H_2O_2 /UV, H_2O_2 , et UV sur les concentrations des différentes fractions de matières organiques en l'absence de biofilms et en portant un intérêt particulier à la fraction biodégradable. Son élimination probable par les traitements biocides pourrait renforcer l'hypothèse d'un mécanisme d'action par privation nutritionnelle.

Notre étude montre que la performance du traitement H_2O_2 /UV est plus élevée que celle des UV et de l' H_2O_2 appliqués séparément. Cette performance dépend de plusieurs paramètres :

- la concentration initiale du carbone organique. Ce résultat est en adéquation avec l'étude de Sarathy *et al.* (2009) qui montrent que le pourcentage du COT éliminé par ce procédé dépend entre autre de la concentration initiale de ce dernier. Ce pourcentage passe de 15% pour une solution contenant 2,18 ppm de COT à 27% pour une solution contenant 0,9 ppm de COT ;
- la composition de la solution de matière organique (présence ou absence des particules). Lors des traitements des solutions d'acides humiques filtrées et standards, les pourcentages de COT et du COD éliminés les plus élevés ont été obtenus avec les solutions filtrées. La filtration de la solution de matières organiques a donc visiblement amélioré l'efficacité du procédé par l'élimination des particules organiques qui seraient à l'origine d'un effet de masque vis-à-vis des radiations UV. Ce résultat est en adéquation avec les résultats d'Escobar *et al.* (2001), qui montrent également que l'ultrafiltration appliquée en amont du procédé H_2O_2 /UV, améliore la performance de ce dernier pour l'élimination du COT.

Ainsi, la performance du traitement H_2O_2 /UV pour l'élimination du COD et du COT rejoint les résultats que nous avons obtenus lors des essais de traitement des biofilms. L'ensemble de ces résultats est également en adéquation avec l'étude de Vilhunen *et al.* (2010) qui montrent que le couple H_2O_2 /UV est plus efficace que les UV ou l' H_2O_2 , appliqué isolément, pour l'élimination (minéralisation) du COT.

La cinétique d'élimination du COD de la solution d'acides humiques filtrée montre que le pourcentage d'élimination est proportionnel à la durée d'exposition. Les résultats de l'étude de Wang *et al.* (2000) vont dans le même sens que nos résultats. En effet ils ont montré que le COD d'une solution d'acide humiques diminue de 60, 72 et 80 % après 1 h, 2 h et 3 h d'application d'un traitement H_2O_2 /UV, respectivement. La concentration d' H_2O_2 utilisée dans l'étude de Wang *et al.* (2000) était de 147 mM et représente environ 98 fois la concentration de l' H_2O_2 utilisée lors de nos expériences (50 ppm, 1,5 mM). De plus, dans cette étude, les radiations UV étaient appliquées directement dans la masse d'eau (lampe UV immergée dans la solution d'acides humiques). Dans

notre étude les radiations étaient appliquées à travers un système de recirculation. Les différences de procédures peuvent expliquer l'efficacité moindre relevée dans notre étude, bien que l'impact du temps de traitement soit similaire. Vilhunen *et al.* (2010) ont également montré que la performance de ce procédé dépend de la concentration de l' H_2O_2 .

Certaines études montrent que de fortes doses d' H_2O_2 associées à une longue durée d'exposition, permettent de minéraliser la matière organique, même en présence de molécules de hauts poids moléculaire (Sarathy *et al.*, 2007 ; 2009). Cependant l'excès d' H_2O_2 réduit le taux d'oxydation de la matière organique et l'effet chélateur de l' H_2O_2 vis-à-vis des radicaux hydroxyles devient significatif (Wang *et al.*, 2000).

La diminution des concentrations du COD est due à l'oxydation d'une fraction de la matière organique par les radicaux hydroxyles générés par la photolyse de l' H_2O_2 (Sarathy *et al.*, 2007 ; 2009 ; Wang *et al.*, 2000). Lors de nos essais, nous avons mis en évidence un processus de production du COD résultant de l'oxydation partielle des particules organiques. Sarathy *et al.* (2009) montrent qu'en présence de molécule de haut poids moléculaires et à faible dose de peroxyde d'hydrogène ce traitement, aboutit à une oxydation incomplète des matières organiques. Les molécules de haut poids moléculaire sont fragmentées en petites molécules organiques, notamment en molécules organiques biodégradables.

Les concentrations de COD des solutions d'acides humiques, des mélanges acides humiques-tryptone (essai 1) ainsi que de la solution standard d'acides humiques (essai 2) augmentent après l'incubation. Il n'était donc pas possible d'estimer les concentrations du CODB. Ces augmentations pourraient être attribuées à l'hydrolyse du carbone particulaire (COP) par l'activité bactérienne. L'augmentation du COD après l'incubation est plus élevée pour les solutions traitées à l' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$. Ce traitement, appliqué pendant 1 h et 6 h, fragmenterait partiellement les molécules organiques de poids moléculaires élevés qui seraient alors plus accessibles à l'activité microbienne pour poursuivre ainsi leur oxydation. C'est cette action combinée et probablement en cascade du couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ et de l'activité bactérienne qui expliquerait l'augmentation après l'incubation, des concentrations du COD dans les solutions contenant les particules de carbone. La vitesse de production de COD à partir du COP serait supérieure à la vitesse de sa consommation par les bactéries, ce qui expliquerait son augmentation dans les solutions à base d'acides humiques non filtrées.

L'application du couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ sur la solution de tryptone (essai 1) et la solution d'acides humiques filtrée (essai 2) aboutit à la diminution des concentrations du CODB de ces deux solutions. Certaines études montrent que les radicaux hydroxyles réagissent préférentiellement avec les molécules organiques de haut poids moléculaire. En l'absence de ces molécules, les OH^\bullet réagissent avec les molécules de faible poids moléculaire, telles que les molécules hydrolysables et aboutissent à leur minéralisation.

Les résultats de l'essai 3 réalisé sur des solutions d'un mélange d'acides humiques et de tryptone viennent confirmer les résultats des deux essais précédents :

- 1- seul le traitement $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ permet de réduire significativement les concentrations de COD et de CODB, et parfois les proportions de CODB ;
- 2- la performance de ce traitement est plus élevée sur des solutions dépourvues de particules organiques (solution filtrée *versus* solution standard). Ces résultats apportent des arguments en faveur de l'hypothèse émise à propos du rôle des particules de carbones dans le processus de production de COD.

Des informations supplémentaires apportées par l'analyse HPSEC montrent que le couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ modifie les profils moléculaires des solutions de matières organiques par l'élimination de

certaines molécules et la production des molécules de petite taille. Cette analyse confirme par ailleurs un effet qualitatif des UV appliqués seuls en apportant de légères modifications aux profils moléculaires des solutions de matières organiques.

Le traitement que nous avons appliqué, délivre une dose totale d'UV de plus de 13000 mJ/cm² (1 h d'exposition, débit de 500L/h, volume de 6L) et la concentration de l'H₂O₂ a été maintenue à 50 ppm. Au regard de la concentration d'H₂O₂ et des doses d'UV délivrées, il n'est pas anormal que le CODB baisse ou disparaisse entièrement, comme nous l'avons montré pour les différentes solutions de matières organiques.

Ce constat renforce l'hypothèse selon laquelle le traitement H₂O₂/UV, dans les conditions qui ont été celles de nos expériences, agirait également par privation nutritionnelle. Ces conditions sont les suivantes :

- [H₂O₂] maintenue à 50 ppm ;
- UV₂₅₄ 60 mJ/cm² (à chaque passage par le réacteur UV) ;
- Débit de renouvellement 500 L/h
- Durée d'application : plusieurs jours

Il est évident que ces valeurs devraient être modifiées pour que le procédé conserve son efficacité dans d'autres contextes (concentration et nature de la charge en matières organiques).

Mode d'action du procédé H₂O₂/UV

Notre étude montre que la performance de l'H₂O₂/UV est supérieure à celle des UV seuls et de l'H₂O₂ seul appliqués à la même puissance et aux mêmes concentrations.

La performance élevée du couplage pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses :

- 1) un effet direct par la formation de radicaux OH[•] à partir de l'H₂O₂ sous l'effet des UV empêcherait tout à la fois, l'adaptation des bactéries au peroxyde d'hydrogène et la mise en œuvre de mécanismes de réparation des dommages provoqués par les UV. Shang *et al.* (2009) ont en effet montré que les radicaux OH[•] inhibent les mécanismes de défense des bactéries vis-à-vis des UV. La durée de vie de radicaux OH[•] est cependant extrêmement faible (inférieure à la microseconde) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles (inférieures à la dizaine de nanomètres). À l'opposé, les radicaux superoxydes sont caractérisés par une relative inertie chimique. Ces deux éléments ainsi que l'architecture de notre dispositif, pourraient ne pas expliquer à eux seuls, l'efficacité du procédé par un effet direct. Une étude complémentaire par ajout de chélateurs des radicaux OH[•] au dispositif expérimental aurait pu apporter un éclairage sur le rôle réel de ces radicaux dans nos expériences ;
- 2) un effet indirect suite à la formation de molécules toxiques secondaires par la réaction des radicaux hydroxyles avec les différents composés organiques et notamment les constituants biologiques des cellules bactériennes (ADN, protéines, lipides...). Par exemple, la dégradation des acides gras insaturés aboutit à la formation de plusieurs sous-produits dont les aldéhydes. Ces derniers sont également très réactifs et peuvent endommager des molécules telles que les protéines. Les aldéhydes, contrairement aux radicaux hydroxyles, ont une inertie chimique plus élevée et peuvent diffuser du lieu de leur production (Cabiscol *et al.*, 2000). Ils peuvent, de ce fait, agir comme des espèces toxiques secondaires, agissant sur des cibles éloignées de leur site de production comme dans le cas de nos essais où les biofilms sont éloignés du site de production des radicaux hydroxyles ;

- 3) un effet indirect par l'oxydation de la matière organique sous l'effet du couple H_2O_2/UV aboutissant à une privation nutritionnelle qui agirait de façon non spécifique sur les communautés microbiennes du biofilm ou planctoniques.

Selon nos résultats, le mode d'action du couple H_2O_2/UV dans les conditions de nos essais, s'établirait comme suit :

- un effet direct par les radicaux hydroxyles qui agissent plutôt sur les microorganismes et la matière organique en suspension, à condition que le niveau de ces radicaux soit suffisamment élevé pour limiter le phénomène d'adaptation (nécessité de radiations UV et d'un flux minimale d' H_2O_2) ;
- un effet indirect par privation nutritionnelle, l'indisponibilité des nutriments suite à leur oxydation, empêcherait les communautés microbiennes de développer une réponse adaptative vis à vis du stress oxydatif ;
- par ailleurs, l'hypothèse d'un effet indirect par la production d'espèces toxiques secondaires suite à la réaction des radicaux OH^\bullet avec les différents composés organiques, n'a pas pu être confirmée, ni écartée. Les données bibliographiques citées ci-dessus à propos de la production d'aldéhyde suite à la dégradation des acides gras insaturés (Cabiscol *et al.*, 2000) concordent néanmoins avec cette hypothèse.

Cette étude a permis d'établir une hiérarchie en termes de performance des 3 procédés du traitement vis-à-vis des biofilms : $H_2O_2/UV > H_2O_2 > UV$. Elle permet également d'envisager d'autres perspectives dans le traitement des biofilms. En effet, les résultats observés lors des premières heures d'application de l' H_2O_2 seul permettent d'envisager des traitements discontinus à des doses plus élevées d' H_2O_2 qui seraient létales pour les bactéries possédant la réponse adaptative vis-à-vis de l' H_2O_2 . Un traitement discontinu réduirait les difficultés d'application liées à un traitement continu et en réduirait le coût. L'application discontinue d' H_2O_2 seul permettrait de réduire la dépendance énergétique et éviterait les modifications d'installations des TARs liées à l'emploi des UV.

VI- Optimisation des conditions d'application du procédé SECUROX : étude expérimentale

VI Chapitre VI : Optimisation des conditions d'application du procédé SECUROX : étude expérimentale.

VI.1 Contexte de l'étude

Le procédé de traitement « Securox » à base de ClO_2 est déjà mis sur le marché et encore actuellement commercialisé. Malgré ces multiples avantages, il représente une des sources potentielles de sous-produits inorganiques tels que les ions chlorites (ClO_2^-) et chlorates (ClO_3^-). La quantité de sous produits de désinfection, nocifs pour l'environnement, dépend de la concentration de ClO_2 appliquée. Cette étude s'inscrit donc dans un objectif d'optimisation des conditions d'application du procédé pour réduire cet effet indésirable tout en conservant une meilleure performance. A l'image de celle effectuée pour le procédé « PEROX », elle est plus particulièrement dédiée aux effets du traitement sur les communautés microbiennes fixées et non pas sur les microorganismes en suspension.

L'objectif ici, est de rechercher des conditions optimales d'application du procédé pour le contrôle des biofilms des tours aéro-réfrigérantes ouvertes tout en prenant en compte le taux de reviviscence.

VI.2 Résultats

VI.2.1 Adaptation des biofilms aux conditions de laboratoire

Pour rappel, nous avons fait précéder la phase d'application des traitements, par une phase durant laquelle les biofilms se sont adaptés aux conditions de l'expérimentation. L'adoption de la durée donnée à cette phase lors de l'expérimentation Perox, ne se justifiait pas ici, du fait du changement de deux paramètres expérimentaux :

- 1- La durée de colonisation des biofilms dans la source Soufre était réduite à 10 jours au lieu des 15 jours utilisés lors des essais PEROX ;
- 2- L'eau de circulation (eau du réseau d'eau potable de la commune du Bourget du Lac, filtrée sur charbon actif), n'était pas supplémentée, ici, en matières organiques.

Ces modifications ont été faites, comme nous l'avons déjà signalé, pour introduire dans la durée des expériences, une phase d'observation d'une éventuelle reviviscence. Une étude de l'adaptation des biofilms à ces nouvelles conditions a donc été nécessaire.

Quatre indicateurs du biofilm ont été suivis : ATP, bactéries hétérotrophes cultivables à 25°C, bactéries totales et amibes. Les résultats des suivis des biofilms (figure 120) montrent que l'évolution des indicateurs peut être divisée en deux phases. Durant la première phase les concentrations des indicateurs subissent une baisse significative entre T0 (analyse effectuée à la fin de la phase d'incubation dans la source « S ») et 96 h d'incubations dans les réacteurs. Durant la deuxième phase (après 96 h) les concentrations sont relativement stables. Les essais ont été réalisés simultanément sur deux bancs de réacteurs de façon à évaluer le degré d'hétérogénéité qui pouvait s'établir entre eux. Ces résultats montrent qu'il n'apparaît globalement pas de différences significatives entre les deux bancs du point de vue des indicateurs mesurés.

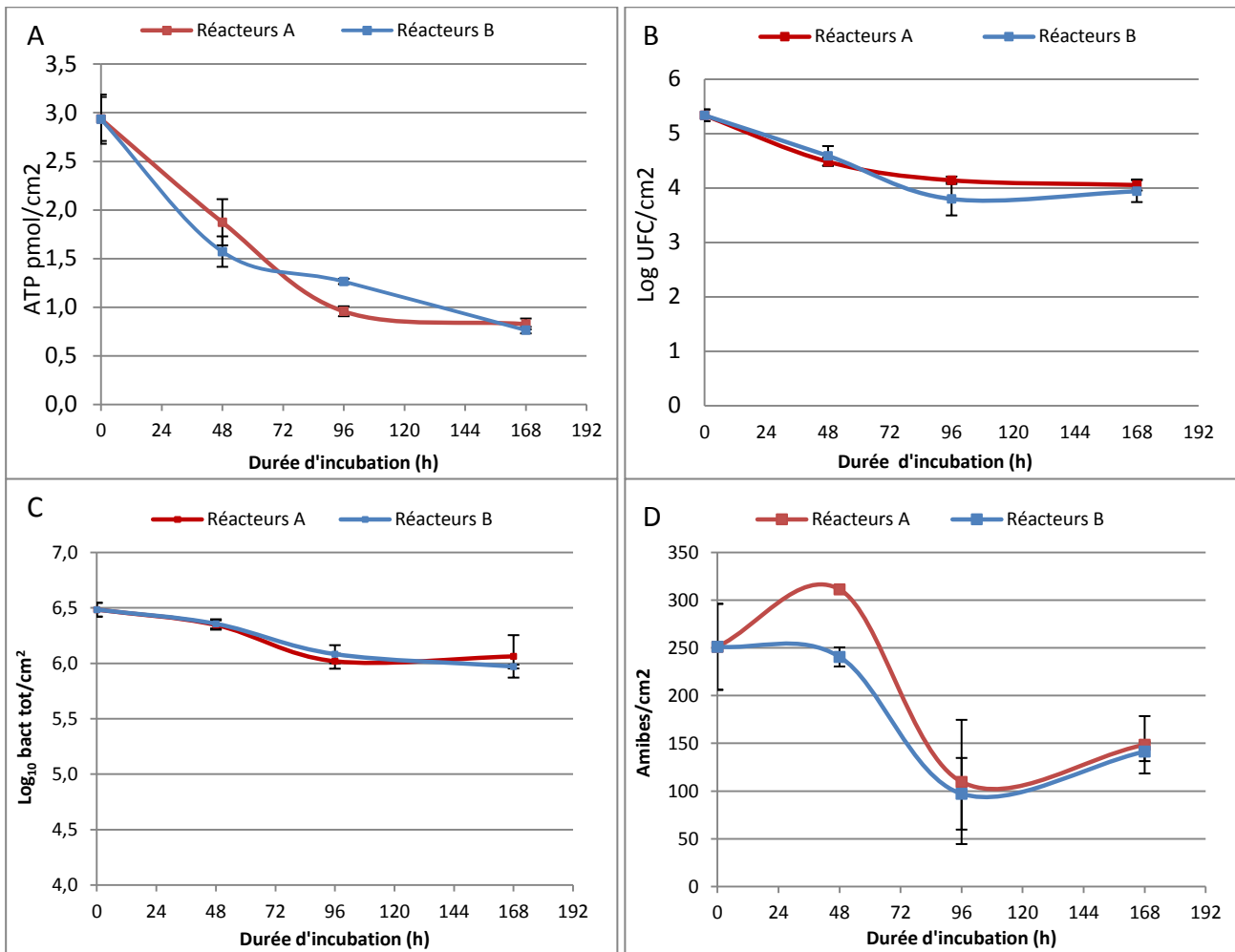


Figure 120 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm²) (A), des bactéries cultivables (Log₁₀ UFC cm²) (B) des bactéries totales (Log₁₀ N cm²) (C) et des amibes (Amibes/cm²) au cours de la phase d'adaptation des biofilms. Les points et Les barres d'erreurs représentent les moyennes et les écarts type de trois mesures.

Ainsi, la stabilisation des concentrations des indicateurs biologiques du biofilms débute selon nos résultats à 96 h, elle est définitivement acquise à 168 h. Nous avons donc considéré que l'adaptation des biofilms aux conditions expérimentales était acquise à 168 h d'incubation (7 jours), valeur que nous avons fixée comme phase d'adaptation qui sera appliquée aux biofilms avant le début des traitements biocides au ClO₂. Les durées des différentes phases de cette étude sont présentées dans la figure 121.

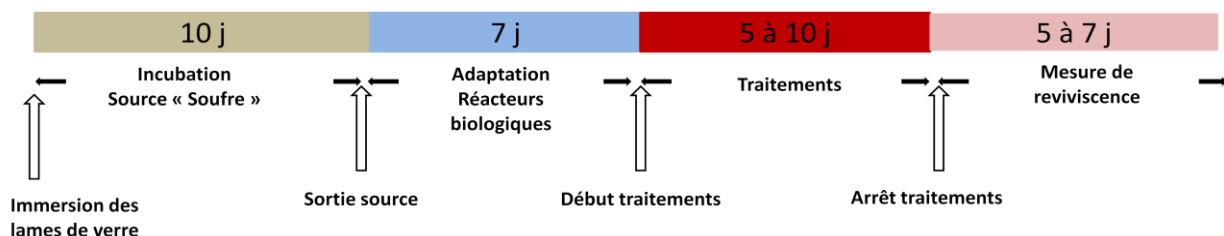


Figure 121 : Schéma récapitulatif de la procédure expérimentale de l'étude de l'efficacité du traitement SECUROX.

VI.2.2 Etude de l'efficacité du procédé SECUROX

VI.2.2.1 Conduite des essais

A chaque phase d'expérimentation, deux traitements au ClO_2 ont été appliqués sur les biofilms selon deux modalités d'injection : continue et discontinue. Lors des traitements par injection continue le flux de ClO_2 a été réglé afin de maintenir la concentration à 0,1 ppm (phase 1) ou à 0,05 ppm (phase 2 et 3). Dans un premier temps, les quantités initiales de 10 mg ou de 5 mg ont été injectées dans un volume de 100 L d'eau pour aboutir respectivement aux concentrations de 0,1 ppm et de 0,05 ppm. La concentration en ClO_2 a été suivie avec un pas de temps court durant les trois premières heures de la phase de traitement de façon à faire à temps les ajustements nécessaires au maintien de la concentration cible choisie (0,1 ppm ou 0,05). Par la suite, le suivi a été espacé bien que de nouveaux ajustements ont parfois été nécessaires.

Concernant les traitements discontinus, l'injection a été réalisée comme suit :

- Phase 1 : injection de 10 mg de ClO_2 à raison de deux injections de 5 mg par jour à 8h30 et à 20h30 ;
- Phase 2 : injection de 50 mg de ClO_2 à raison de quatre injections de 12,5 mg/ injection (toutes les 6 h) ;
- Phase 3 : injection de 25 mg de ClO_2 à raison de quatre injections de 6,25 mg/ injection (tous les 6 h) ;

Les prélèvements étaient effectués à 8 h, c'est-à-dire avant la première injection du traitement discontinu. Le traitement a été arrêté après 144 h d'incubation lors de la 1^{ère} et de la 2^{ème} phase et après 312 h lors de la 3^{ème} phase.

Les mesures ont été poursuivies au-delà jusqu'à 312 h lors des deux premières phases et jusqu'à 456 h lors de la dernière phase, pour la mise en évidence d'éventuels phénomènes de reviviscence. Trois lames ont été prélevées dans chacun des circuits (référence, traitement continu, traitement discontinu) à raison d'une lame par réacteur pour récupérer les biofilms et réaliser les analyses microbiologiques.

VI.2.2.2 Phase 1 : Comparaison d'un traitement continu à 0,1 ppm de ClO_2 et d'un traitement discontinu à 10 mg/ jour

VI.2.2.2.1 Evolution des concentrations de ClO_2 , de la température et de la conductivité

Les concentrations de ClO_2 , la température et la conductivité ont été suivies au cours des traitements au ClO_2 . Aucune différence significative de température ne s'est établie entre les trois réservoirs d'eau. Leur température moyenne a été de $22,06 \pm 1,51^\circ\text{C}$ (tableau 38).

La conductivité a été similaire dans le circuit de référence et le circuit recevant le traitement discontinu et a varié de 270 à 288 $\mu\text{S}/\text{m}$. Elle a par contre été plus élevée dans le circuit traité en continu avec des variations entre 270 à 296 $\mu\text{S}/\text{m}$ (tableau 38).

Tableau 38 : Résumé des valeurs de la concentration en ClO₂, de la température et de la conductivité associées au circuit de référence et aux circuits "essais" de la 1^{ère} phase d'expérimentation.

Traitement	[ClO ₂] ppm moyenne	Quantité ClO ₂ injecté (mg/jour)	Température moyennes °C	Conductivité T0 µS/m	Conductivité fin traitement µS/m
Référence Continu (0,1 ppm)	/	/	21,8±1	270	288
Discontinu 10 mg/jours	0,11 ±0,03	50,83	22,2±1,2	270	295
	0,035±0,015	10	22,3±1,3	270	288

La figure 122 présente l'évolution des concentrations de ClO₂ dans les trois circuits.

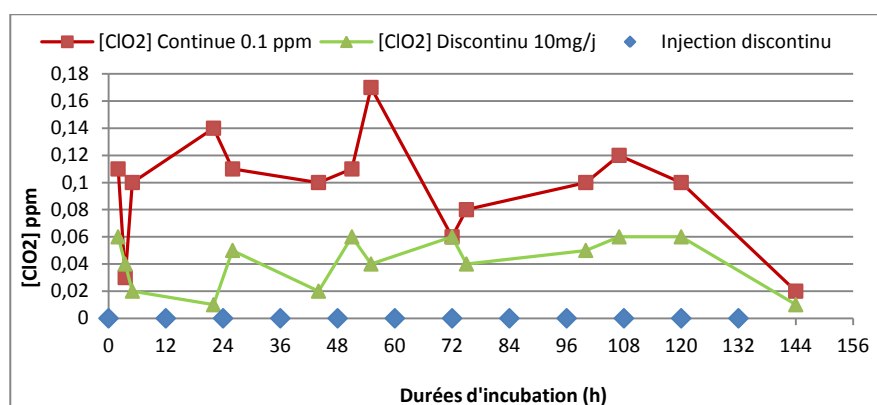


Figure 122 : Evolution de la concentration du ClO₂ dans le circuit recevant un traitement discontinu (10 mg/jour, courbe verte) et dans celui qui était traité en continu (0,1 ppm de ClO₂, courbe rouge). Les losanges bleus représentent les heures d'injection de ClO₂ du traitement discontinu.

Dans le cas du traitement continu, l'évolution du ClO₂ montre que les concentrations se situent aux alentours de 0,1 ppm. L'objectif du maintien d'une concentration de 0,1 ppm a globalement été atteint, avec toutefois, des écarts qui ont été importants du fait du caractère manuel des ajustements. Le suivi des concentrations et le débit d'injection de ClO₂ qui dépend de ces concentrations ont en effet été réalisés d'une façon manuelle d'où les variations des concentrations observées. Pour cet essai, la concentration moyenne de ClO₂ s'est établie à 0,11 ±0,03 ppm et la quantité totale injectée par jours était de 50,83 mg (tableau 38).

Dans le cas du traitement discontinu, l'oscillation des points (triangles verts) résulte pour partie, de l'augmentation de la concentration de ClO₂ immédiatement après les injections (losanges bleus). La concentration moyenne s'est établie à 0,035 ± 0,015 ppm.

Les résultats montrent ainsi que la quantité totale de ClO₂ qui a due être injectée pour le maintien d'une concentration de 0,1 ppm a été de 50 mg/jour, 5 fois supérieure donc, à la valeur théorique de 10 mg qu'il faudrait injecter dans un volume d'eau de 100 L pour obtenir cette concentration en l'absence de processus "consommateurs" de ClO₂. Symétriquement l'injection de 10 mg/j dans le réservoir (de 100 L, lui aussi) du traitement discontinu a conduit à une concentration près de 3 fois inférieure à la concentration attendue. La perte de ClO₂ par 'stripping' et sa consommation par la charge organique des biofilms expliquent ces facteurs de décalage dont on constate qu'ils sont du même ordre de grandeur. Ils diffèrent probablement du fait qu'ils sont issus de mesures faites à des moments différents sur des circuits qui étaient en perpétuelle évolution.

La mise en correspondance des concentrations observées (colonne 3 du tableau 39) et des apports quotidiens qui ont été nécessaires pour les maintenir (colonne 2 du tableau 39), permet de donner une valeur approximative de la "consommation" quotidienne de ClO₂ (colonne 6 du tableau 39). Exprimée en valeur relative par rapport à la quantité quotidienne injectée, cette valeur apparaît plus importante dans le cas où la quantité de biocide apportée a été la plus grande (colonne 7 du tableau 39). Les quantités de biofilm et l'hydrodynamique étant les mêmes dans les deux circuits, il semble qu'il faille mettre en cause le mode d'injection et/ou l'importance de la quantité de ClO₂ injectée pour expliquer cette différence. L'interprétation plus fine de cet excès de "consommation" de produit et la recherche d'une valeur d'injection optimale qui le minimiserait nécessiteraient l'acquisition de nouvelles mesures.

Tableau 39 : Approche théorique des consommations quotidiennes de ClO₂ dans les réacteurs "essais".

1	2	3	4	5	6	7
traitement	Quantité inj./j (mg)	concentration moyenne (ppm)	quantité moy résiduelle de ClO ₂ dans les réservoirs (mg)	ClO ₂ résiduel / ClO ₂ injecté par jour (%)	consom. (mg/24 h)	consommation / Q quotidienne injectée (%)
continu	50,8	0,11	11	22	39,8	78
discontinu	10,0	0,035	3,5	35	6,5	65

VI.2.2.2.2 Effet des traitements sur les concentrations des indicateurs biologiques du biofilms :

VI.2.2.2.2.1 Activité métabolique:

L'évolution des concentrations de l'ATP au cours de cet essai est présentée dans la figure 123.

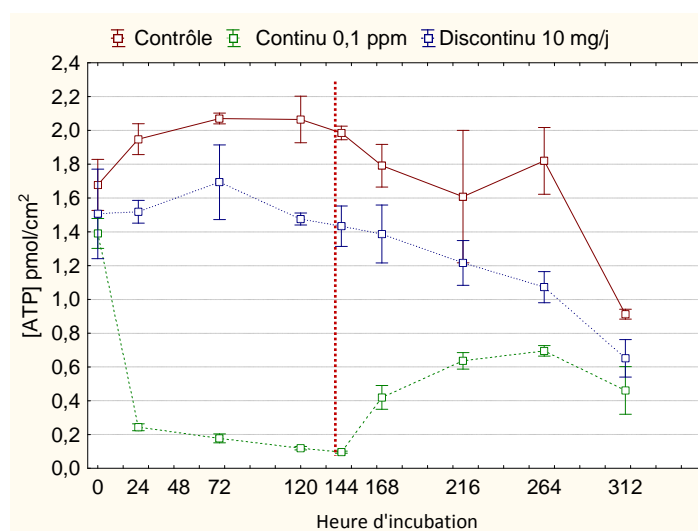


Figure 123 : Evolution des concentrations d'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO₂), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.

Au cours de la phase de traitement (jusqu'à 144 h) les concentrations d'ATP dans les biofilms de référence sont relativement stables, toutefois, un accroissement de cette concentration a été observé avant sa stabilisation

Cet accroissement de l'activité métabolique microbienne n'est pas observé dans le réacteur soumis au traitement discontinu. Les concentrations de l'ATP, initialement stables, tendent à décroître à partir de 72 h d'incubation, comme d'ailleurs au niveau du dernier point de mesure du réacteur de référence.

Dans le réacteur soumis au traitement continu, les concentrations d'ATP diminuent significativement dès le 1^{er} point de mesure. Cette diminution se poursuit avec une pente plus faible jusqu'à la fin de la phase de traitement. Ces résultats démontrent donc que l'effet du biocide est manifeste sur l'activité métabolique des biofilms.

Ces résultats montrent, du point de vue de l'ATP, que la concentration de ClO₂ à 0,035 ppm n'a qu'un effet biostatique alors que la concentration de 0,1 ppm a un réel effet biocide.

Cependant, la participation du mode d'injection aux écarts observés est impossible à déterminer et ce d'autant plus que la plus forte concentration de ClO₂ était associée au traitement continu.

La poursuite des mesures au-delà de l'arrêt des traitements a permis de mettre en évidence le processus de reviviscence des biofilms. Ce processus se traduit par une augmentation des concentrations d'ATP et ne se produit que dans le cas du traitement qui s'est avéré le plus efficace sur l'activité microbienne (traitement continu avec une concentration de 0,1 ppm de ClO₂). Il est à noter aussi que le phénomène se produit rapidement, dans les 24 h qui suivent l'arrêt du traitement pour atteindre un plateau à 216 h.

Aucune reviviscence n'a par ailleurs été observée dans le circuit de référence et le circuit recevant un traitement discontinu. Dans le circuit de référence la baisse de la concentration de l'ATP, amorcée à 120 h, se poursuit jusqu'à 312 h. De la même manière, la baisse de la concentration d'ATP dans le circuit recevant le traitement discontinu se poursuit même après l'arrêt du traitement, jusqu'à 312 h.

Dans les deux cas, il est probable que cette baisse ait eu la même origine dès la 144^{ème} heure d'incubation. La cause la plus probable de cette baisse d'activité est l'épuisement du milieu en nutriments organiques. Dans le cas du réacteur traité en continu, l'épuisement de cette ressource apparaît ainsi avoir été différé (après 264 h) et ce, probablement, pour deux raisons :

- le fort ralentissement de la consommation conséquent à l'action du biocide (dans le cas du traitement continu uniquement) ;
- le re-enrichissement de l'eau en matières organiques qui peut lui aussi avoir deux origines :
 - o des lyses cellulaires dues également à l'action du traitement ;
 - o la formation de composés organiques biodégradable tels que des aldéhydes ou des acides carboxyliques à courte chaîne, à partir de composés plus réfractaires (Dabrowska *et al.*, 2003 ; Ivancev *et al.*, 2001, Stanislawiak *et al.*, 2004).

Il est à noter qu'il n'apparaît aucun bénéfice de l'épargne de carbone organique dissous qui a pu résulter du ralentissement de l'activité microbienne dans le cas du traitement discontinu.

Ce résultat illustre bien les causes connues du processus de reviviscence : l'éradication incomplète des bactéries et la mise à disposition des cellules survivantes d'une quantité de nutriments relativement plus importante. Il est à noter cependant que les valeurs du banc traité en continu restent toujours inférieures à celles des deux autres bancs.

VI.2.2.2.2 Bactéries cultivables

L'évolution des concentrations de bactéries cultivables est présentée dans la figure 124.

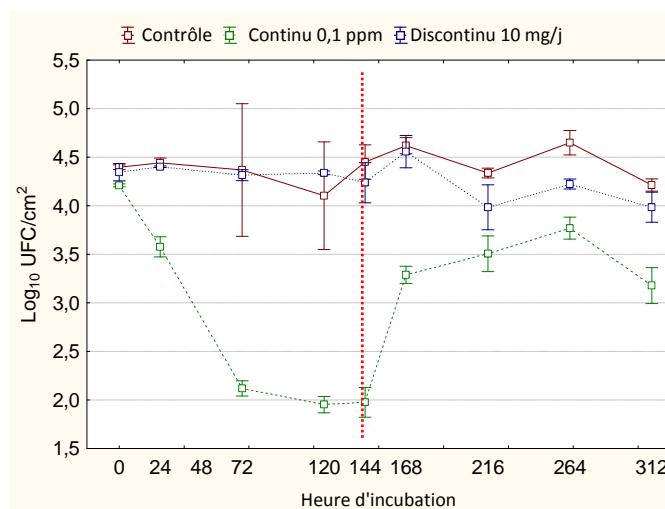


Figure 124 : Evolution des concentrations de bactéries cultivables ($\text{Log}_{10} \text{UFC}/\text{cm}^2$) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.

Les résultats présentés dans la figure 124 confirment ceux obtenus avec les concentrations de l'ATP. Aucun effet du traitement discontinu n'a été observé et ce traitement s'avère donc inefficace vis-à-vis des bactéries cultivables. Néanmoins, la concentration des bactéries cultivables dans le banc traité par injection discontinue devient plus faible que celle du banc témoin mais l'écart reste faible et peu significatif. Cette diminution des concentrations de bactéries cultivables pourrait s'expliquer par un effet tardif du ClO_2 sur les biofilms et à terme par une mort cellulaire. Aucune reviviscence n'a été observée pour ces deux bancs mais on observe plutôt une diminution des concentrations en fin d'incubation.

Dans le cas du traitement continu les concentrations de bactéries cultivables dans les biofilms diminuent significativement entre 0 et 72 h. Cette diminution se poursuit jusqu'à l'arrêt du traitement mais avec une pente plus faible. L'effet de l'injection continue de ClO_2 est manifeste puisqu'il aboutit à un abattement de plus de 2 Log. Ces concentrations se stabilisent à des niveaux très faibles jusqu'à l'arrêt de traitement (environ 2 Log).

De la même manière que pour l'ATP, une reviviscence se produit uniquement pour le traitement continu, dès l'arrêt du traitement. L'augmentation des concentrations des bactéries cultivables conduit à des concentrations qui restent inférieures à celles du témoin et du banc ayant subi le traitement discontinu pour lesquels aucune reviviscence n'a été observée. Les concentrations des bactéries cultivables diminuent de nouveau à partir de 264 h d'incubation. Cette baisse, ainsi que celle observée dans les deux autres bancs, pourrait être attribuée à l'effet d'une carence nutritionnelle.

VI.2.2.2.3 Bactéries totales

L'évolution des concentrations de bactéries totales est présentée dans la figure 125.

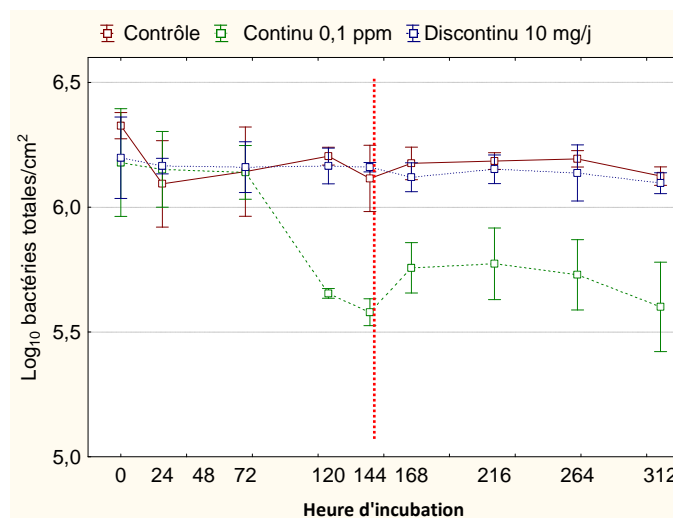


Figure 125 : Evolution des concentrations de bactéries totales ($\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.

Les résultats présentés dans la figure 125 confirment l'absence d'effet du traitement discontinu à 10 mg/jour. Les évolutions de la concentration des bactéries totales dans le banc soumis à ce traitement et dans le témoin sont identiques tout au long du suivi. Par contre, elles diminuent sous l'effet du traitement continu à 0,1 ppm. Cette diminution est néanmoins de faible amplitude (0,75 Log) et surtout tardive (à partir de 72 h d'application) par comparaison à ce qui a été observé pour l'ATP et les bactéries cultivables. Ce constat est très probablement lié à la technique de dénombrement qui ne différencie pas les cellules vivantes et mortes. Il indique aussi qu'un temps d'exposition relativement long est nécessaire pour que l'intégrité des bactéries soit touchée.

Une légère reviviscence est également observée pour cet indicateur après l'arrêt du traitement. Cette reviviscence est néanmoins de faible amplitude (0,2 Log) et reste inférieure d'un demi-Log aux concentrations du témoin et du traitement discontinu. Une légère baisse des concentrations est observée après 312 h dans les 3 bancs, cette baisse peut être attribuée comme pour les deux précédents indicateurs, à une carence nutritionnelle.

VI.2.2.2.4 *Legionella pneumophila*

Lors de cet essai aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'a été détectée par culture sur le milieu GVPC. Seuls les dénombrements de "*L. pneumophila* totales" réalisés par immunofluorescence ont pu être pris en compte. L'évolution des concentrations des *L. pneumophila* totales est présentée dans la figure 126.

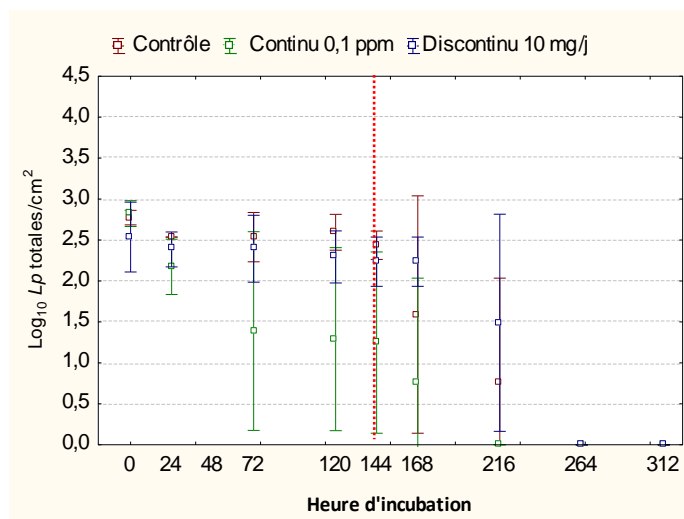


Figure 126 : Evolution des concentrations de *L. pneumophila* totales ($\text{Log}_{10} \text{Lp}/\text{cm}^2$) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.

L'évolution des concentrations des *L. pneumophila* totales ne permet pas de conclure sur les effets des traitements biocides. Certains de ces dénombrements se sont révélés très variables en raison d'effets de masque dus aux autres éléments des biofilms mis en suspension. Il en résulte des valeurs dont les incertitudes se chevauchent. Les *L. pneumophila* deviennent indétectables dès 216 h mais tout autant dans les essais que dans le témoin.

VI.2.2.2.5 Amibes

L'évolution des concentrations des amibes est présentée dans la figure 127.

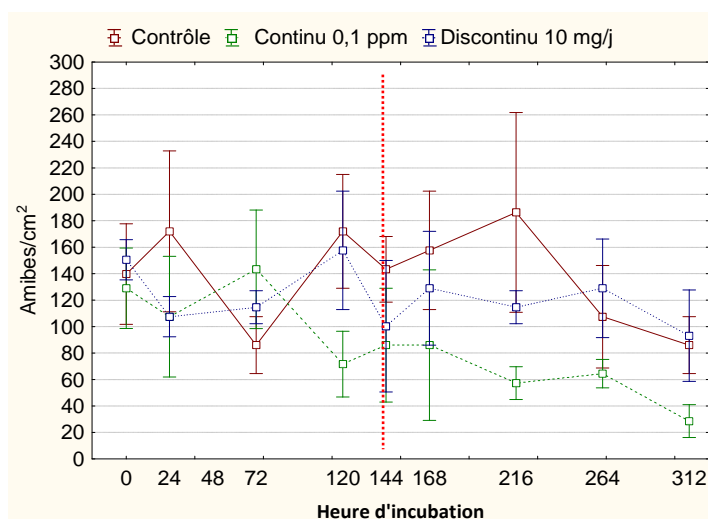


Figure 127 : Evolution des concentrations des amibes ($\text{Amibes}/\text{cm}^2$) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.

Les résultats du dénombrement des amibes sont également associés à des incertitudes très fortes. Aucune différence significative n'a été observée entre les concentrations des réacteurs de référence et celles des réacteurs recevant le traitement par injection discontinue, tandis que ces concentrations diminuent sous l'effet du traitement continu (0,1 ppm) dès 72 h d'application. Il semble donc que le traitement continu ait eu un effet et que son arrêt n'ait pas donné lieu à une reviviscence des amibes.

En conclusion

La 1^{ère} phase d'expérimentation a permis de montrer l'inefficacité du traitement discontinu à 10 mg/jour de ClO₂ (concentration moyenne de 0,035 ppm). Concernant le traitement continu, il s'est avéré efficace pour tous les indicateurs dont les résultats ont pu être exploités. Aucune conclusion ne pu être tirée de la comparaison de l'efficacité des deux modes d'injection en raison de l'écart élevé entre les concentrations de ClO₂ observées dans les circuits.

Les deux indicateurs liés à l'activité métabolique des biofilms, en l'occurrence l'ATP et les bactéries cultivables, se sont révélés les plus sensibles au traitement continu à 0,1 ppm (baisse de 86 % de la concentration en ATP, par exemple). Les résultats montrent cependant que cette sensibilité peut poser problème sur le plan des protocoles expérimentaux. Ainsi, une diminution de la concentration en ATP a été observée dans la culture témoin, dès 120 h, qui n'a pas son équivalent avec la concentration des bactéries cultivables. Cette diminution témoigne de la dégradation des conditions d'incubation des biofilms (due probablement au caractère limitant des nutriments) qui peut représenter un artéfact pour l'appréciation des effets des traitements dans le cadre de cultures de "longues" durées.

Cette phase d'expérimentation a également mis en évidence une reviviscence des biofilms immédiatement après l'arrêt du traitement. C'est probablement en liaison avec les raisons du facteur limitant des nutriments, évoqué ci-dessus, que cette reviviscence n'a pas restauré ici les niveaux initiaux des concentrations bactériennes.

VI.2.2.3 Phase 2 : Comparaison d'un traitement continu à 0,05 ppm de ClO₂ et d'un traitement discontinu à 50 mg/ jour

VI.2.2.3.1 Evolution de la température, de la conductivité et des concentrations en ClO₂

Durant cette deuxième phase, la température de l'eau dans les réservoirs a été en moyenne de 25±1,5°C, sans différence significative entre eux. En absence d'une régulation de la température par un thermoplongeur comme cela a été le cas pour les essais « Perox », les réservoirs subissent passivement les conditions de la température ambiantes du laboratoire. Leur température a en effet évolué au cours des trois premiers jours, en passant de 27°C à 25°C puis en oscillant entre 23°C et 24°C jusqu'à la fin des essais.

Lors de cet essai des différences significatives se sont établies entre les réservoirs, tout au long du traitement, du point de vue de la conductivité (tableau 40). A la fin de l'essai, la conductivité la plus élevée a été enregistrée dans le réservoir associé au traitement discontinu à 50 mg/j. Comme indiqué plus bas, l'apport quotidien du traitement continu n'était en effet que d'environ 28 mg/j.

Tableau 40 : Résumé des valeurs de la concentration en ClO₂, de la température et de la conductivité associées au circuit de référence et aux circuits "essais" de la 2^{ème} phase d'expérimentation.

Traitement	[ClO ₂] ppm moyenne	Quantité injectée de ClO ₂ (mg/jour)	Température moyennes °C	Conductivité T0 μS/m (T°C)	Conductivité fin traitement μS/m (T°C)
Référence	/	/	25,72±1,44	300 (27)	267 (23)
Continu	0,046±0,016	27,8	25,01±1,56	301 (27)	290 (23)
Discontinu 4 inj/j	0,102±0,02	50	25,18±1,54	300 (27)	298 (23)

L'évolution de la concentration en ClO₂ pour ce traitement (figure 128) montre que les valeurs ont été un peu inférieures à la concentration cible souhaitée de 0,05 ppm. Il faut rappeler ici que le suivi des concentrations et le réglage des injections étaient réalisés manuellement. La

concentration moyenne de ClO_2 s'est établie à $0,046 \pm 0,016$ ppm et la quantité quotidienne injectée à environ 28 mg/jour.

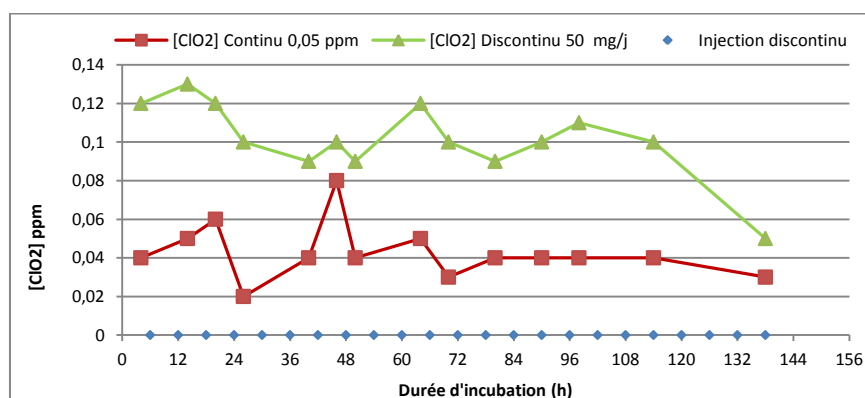


Figure 128 : Evolution des concentrations de ClO_2 au cours d'un traitement continu à 0,05 ppm de ClO_2 (courbe rouge) et du traitement discontinu à 50 mg/jour (courbe verte). Les losanges bleus représentent les heures d'injection de ClO_2 du traitement discontinu.

Dans le cas du traitement discontinu, l'automate avait été programmé pour réaliser quatre injections par jour (toutes les 6 h) pour un total de 50 mg de ClO_2 /jour. La concentration moyenne de ClO_2 résultante a été de $0,102 \pm 0,02$ ppm (tableau 40).

Les résultats du suivi des concentrations montrent une bonne cohérence qui s'est établie entre les quantités injectées et les concentrations résultantes : une concentration de 0,046 ppm de ClO_2 a été obtenue à partir d'une injection "continue" d'environ 28 mg/jour de ClO_2 . Symétriquement, 4 injections de 12,5 mg pour un total de 50 mg/jour ont conduit à une concentration moyenne d'environ 0,1 ppm. Les différences attendues entre les traitements pourront donc résulter de la différence des concentrations moyennes mais aussi du fait que les biofilms ont été soumis, dans un cas, à une concentration plus faible, mais de façon continue, et, dans le second cas, à une concentration plus forte mais seulement à 4 reprises par jour.

VI.2.2.3.2 Effet des traitements sur les indicateurs biologiques du biofilms

VI.2.2.3.2.1 Activité métabolique

L'évolution des concentrations d'ATP est présentée dans la figure 129. Les concentrations d'ATP dans les biofilms soumis aux traitements baissent dès le début de leur application. À 72 h d'application, le traitement discontinu à 50 mg/j (concentration moyenne de 0,1 ppm) aboutit à une valeur minimale d'ATP avec une perte de 74 % de la valeur initiale. Un plateau (stagnation de l'effet du traitement) est ensuite obtenu jusqu'à la fin de l'essai. L'efficacité du traitement discontinu est manifestement plus élevée que celle du traitement continu à 0,046 ppm. En effet ce dernier qui s'avère également avoir un impact sur les biofilms, aboutit à une chute de la valeur initiale de 26 % seulement après 72 h d'exposition. Bien que les différences ne soient pas significatives, l'effet semble cependant s'accroître avec le temps jusqu'à l'arrêt du traitement, date à laquelle la baisse de concentration atteint 44 % de la valeur initiale.

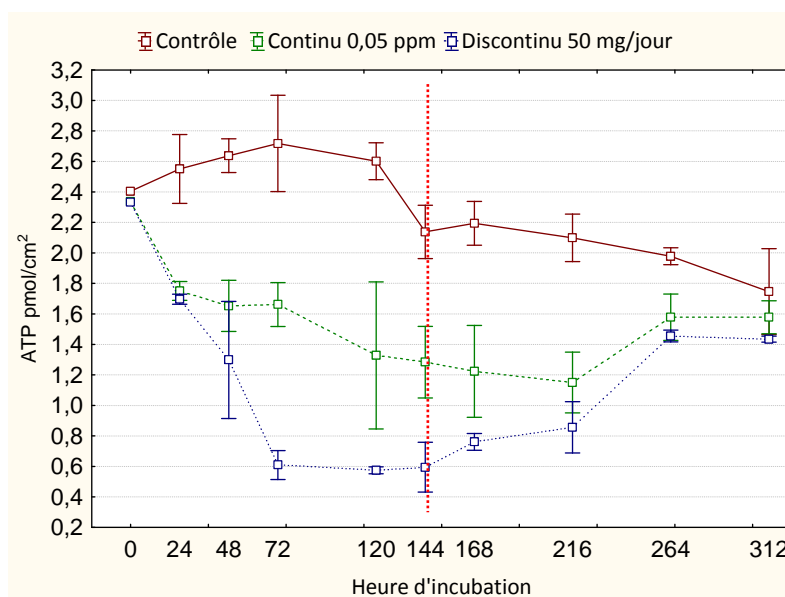


Figure 129 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm^2) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu (courbe verte), traitement discontinu (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

Du point de vue de la reviviscence, une augmentation de la concentration en ATP est bien observée après l'arrêt des traitements. Elle est immédiate dans le cas du banc associé au traitement discontinu (concentration moyenne de ClO_2 de 0,1 ppm) qui s'est avéré le plus efficace. Elle est différée mais effective dans le cas du second traitement aussi associé à une efficacité plus faible. Ces résultats montrent que l'amplitude de la reviviscence semble proportionnelle à l'amplitude de l'effet initial des traitements.

Dans le cas du banc témoin, bien que les différences entre les points ne soient pas significatives, nous pouvons constater une tendance à la diminution de la concentration en ATP dès 120 h d'incubation et jusqu'à la fin de l'essai. Cette décroissance, comparable à celle observée lors de la phase I pourrait également être attribuée à l'épuisement nutritionnel. Les résultats indiquent que les traitements lèvent cette carence, temporairement et au moins en partie, pour les bactéries survivantes. Cette levée de carence pourrait être la conséquence d'une épargne de la ressource en nutriments biodégradables du fait de la diminution de la consommation sous l'effet du biocide et, probablement, d'un ré-enrichissement du milieu du fait de l'action du biocide sur les bactéries initiales du biofilms et les molécules organiques réfractaires.

VI.2.2.3.2.2 Bactéries cultivables

L'évolution des concentrations de cet indicateur sous l'effet des deux traitements est similaire à celle des concentrations d'ATP (figure 130). Les concentrations des bactéries cultivables des biofilms traités baissent sous l'effet des deux traitements. L'amplitude de leur effet est en relation avec la concentration moyenne et les quantités totales de ClO_2 injectées. Dans chacun des cas, l'effet progresse avec le temps jusqu'à la fin du traitement. Néanmoins la pente d'inactivation diminue dès 72 h d'incubation dans le cas du traitement discontinu pour aboutir à un plateau si l'on considère que les différences entre les points ne sont pas significatives, et ce, jusqu'à l'arrêt du traitement.

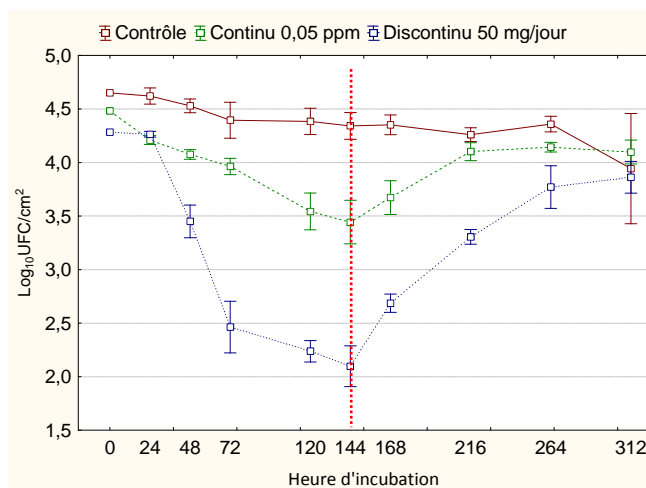


Figure 130 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables ($\text{Log}_{10} \text{UFC}/\text{cm}^2$) dans les biofilms : témoins (courbe rouge) traitement continu (courbe verte), traitement discontinu (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

Comme dans le cas de la concentration en ATP les processus de reviviscence apparaissent proportionnés à l'amplitude de l'effet initial des traitements. Il est à noter, en outre, qu'ils conduisent, au terme de la période d'observation (5 j environ après la fin des traitements) à des concentrations proches des valeurs initiales du biofilms.

VI.2.2.3.2.3 Bactéries totales

L'évolution des concentrations de bactéries totales (figure 131) montrent que ces dernières diminuent dans les biofilms tr quel que soit le traitement appliqué. Néanmoins les effets des deux traitements sont tardifs. La baisse de la concentration devient significative après 72 h, lors du traitement discontinu et après 120 h lors du traitement continu.

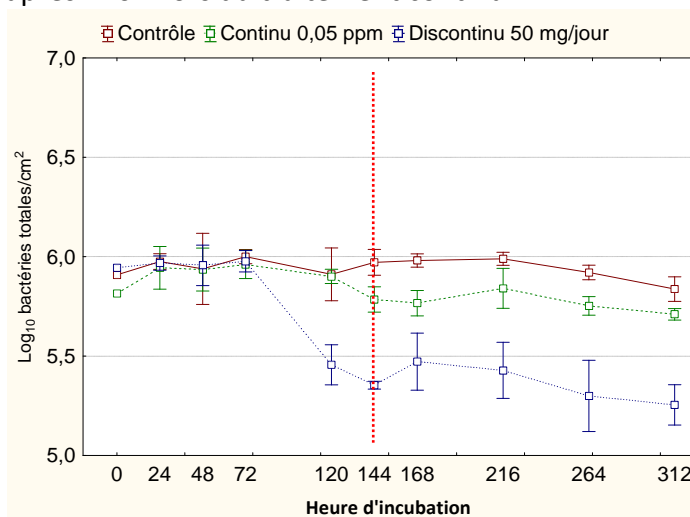


Figure 131 : Evolution de la concentration des "bactéries totales" ($\text{Log}_{10} \text{bact tot}/\text{cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu (courbe verte), traitement discontinu (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

Comme nous l'avons mentionné précédemment pour le même indicateur, ce résultat est conforme avec le fait que la technique de dénombrement ne permet pas de faire la distinction entre les cellules vivantes et les cellules mortes. Il indique aussi qu'un temps d'exposition relativement long est nécessaire pour que l'intégrité des bactéries soit touchée par les

concentrations moyennes auxquelles elles ont été exposées. La durée de ces temps d'exposition est inversement proportionnelle à la concentration de ClO₂.

L'évolution des concentrations des bactéries totales au-delà de l'arrêt des traitements ne fait pas apparaître de recrudescence significative des populations, même dans le cas où l'effet initial avait été le plus marqué (0,1 ppm, traitement discontinu). Il ne faut pas voir ici des résultats contradictoires avec ceux obtenus pour les bactéries cultivables, compte tenu de la proportion que ces dernières représentent dans l'ensemble des populations bactériennes des biofilms : environ 3 % en début de traitement et 0,06 % en fin de traitement (144 h) dans le banc soumis à la concentration moyenne de 0,1 ppm. De plus, la baisse enregistrée dans les concentrations des bactéries totales représente au plus 0,6 Log.

VI.2.2.3.2.4 *Legionella pneumophila*

Aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'a été détectée lors de cet essai. L'évolution des concentrations des *Lp* totales dénombrées par immunofluorescence est présentée dans la figure 132. Aucune conclusion concernant les effets des traitements appliqués sur *L. pneumophila* ne peut être tirée de cette évolution en raison des incertitudes élevées. Aucune différence significative n'est observée entre les concentrations des biofilms témoins et des biofilms traités. Les concentrations de *L. pneumophila* semblent s'inscrire dans une tendance à la baisse après 120 h d'incubation.

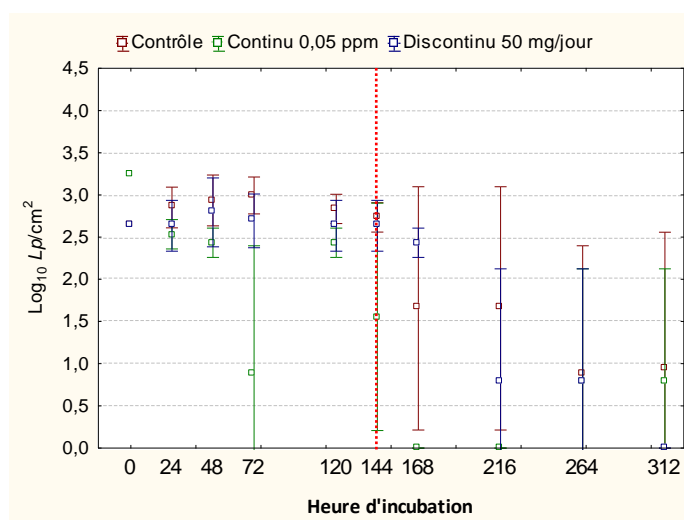


Figure 132 : Evolution de la concentration des "*L. pneumophila* totales" (Log₁₀ Lp tot/cm²) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu (courbe verte), traitement discontinu (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

VI.2.2.3.2.5 *Amibes*

Au cours de cet essai l'évolution des concentrations des amibes dans les biofilms (figure 133) est caractérisée par des valeurs associées à de fortes incertitudes. Ce problème récurrent, est lié au dénombrement d'organismes de faibles concentrations en présence d'éléments annexes qui provoquent des effets de masque très importants. Malgré cet inconvénient nous pouvons considérer que la concentration des amibes dans le banc témoin, est stable pendant les 144 premières heures d'incubation, et qu'elle semble décroître par la suite (figure 133).

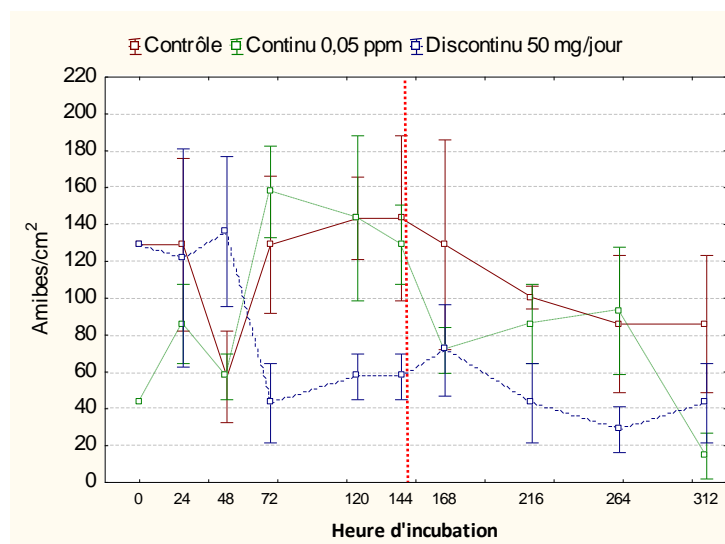


Figure 133 : Evolution des concentrations amibes (amibes/cm²) dans les biofilms non traités (courbe rouge) et dans les biofilms traités par le ClO₂ injecté en continu à une concentration de 0,05 ppm (courbe verte) et en discontinu à 50 mg/jour (courbe bleue). La ligne rouge représente l'arrêt des traitements.

La concentration des amibes semble par contre diminuer sous l'effet du traitement discontinu à 50 mg/j (concentration moyenne de 0,1 ppm) dès 72 h. L'abattement observé qui est de l'ordre de la moitié de l'effectif est significatif et semble limité dans le temps puisque aucun abattement n'est observé au-delà de 72 h.

L'évolution de la concentration amibienne dans le banc soumis au traitement continu (0,05 ppm de ClO₂) est difficilement exploitable vu les variations très fortes entre les points.

En Conclusion

Cette deuxième phase d'expérimentation montre que l'effet de ClO₂ est proportionnelle à sa concentration (ou à la quantité totale injectée). Les résultats apportent la démonstration d'un impact effectif du traitement associé à la plus forte concentration moyenne de ClO₂ (0,1 ppm, injection discontinue) sur la population amibienne, mais cet effet reste de faible amplitude et, comme pour les bactéries, il n'amène pas à une éradication complète des organismes (stagnation de l'effet du traitement) qui se traduit par un plateau dans les courbes d'évolution des concentrations. . A ce stade de l'interprétation des résultats, il est prématuré d'associer l'efficacité du ClO₂ à un mode d'injection du fait que les deux modalités d'injection testée ici diffèrent par :

- 1- la concentration moyenne de ClO₂ (0,1 et 0,046 ppm) ;
- 2- la quantité totale de ClO₂ (50 et 27 mg/j).

La concentration moyenne et la quantité totale injectée de ClO₂ lors du traitement discontinu (0,1 ppm et 50 mg/j) sont comparables à celles du traitement continu de la 1^{ère} phase d'expérimentation (0,11 ppm et 53 mg/j). Une comparaison de l'effet du mode d'injection est donc possible mais après standardisation des résultats pour tenir compte des variations des témoins. Cette comparaison sera faite ultérieurement dans le paragraphe « standardisation des résultats ».

Cette phase expérimentale apporte enfin la confirmation sur deux points :

- l'apparition de processus de reviviscence en aval des traitements, dès qu'ils s'avèrent efficaces, et de façon plus ou moins proportionnée à l'amplitude des effets du biocide ;

- l'intérêt des indicateurs des biofilms impliquant le métabolisme des bactéries, pour leur plus grande sensibilité aux perturbations.

VI.2.2.4 Phase 3 : Comparaison d'un traitement continu à 0,05 ppm de ClO₂ et d'un traitement discontinu à 25 mg/ jour

Suite aux 2 premières phases, les valeurs de la concentration de ClO₂ utilisées durant cette phase ont été choisies pour réaliser une expérience qui permette de comparer de façon claire les modes d'injection.

VI.2.2.4.1 Evolution de la température, de la conductivité et de la concentration en ClO₂

Durant cette phase, la température des réservoirs d'eau était en moyenne de 24±2°C, sans différence significative entre eux. Cet essai a également été caractérisé par deux épisodes thermiques, durant le premier épisode, entre 0 et 96 h, la température a varié de 21 à 23°C, au-delà de 96 h et jusqu'à la fin de l'essai, elle s'est accrue progressivement de 23 à 27°C.

Concernant la conductivité, des différences entre les bancs ont été constatées (tableau 41). La valeur moyenne de la conductivité pour les 3 bancs au début de l'expérience était de 328.3 µS associée à un coefficient de variation de 1%. En fin de traitement, les valeurs observées dans les bancs traités sont logiquement plus fortes que celle du banc témoin. Elles diffèrent également entre elles (moyenne 379,5, CV=2%) dans un sens qui n'est pas en correspondance avec les quantités quotidiennes de ClO₂ reçues. En effet la conductivité, est proportionnelle à la quantité de sels minéraux d'une solution et dans notre cas elle devrait être proportionnelle à la quantité de ClO₂ injectée.

Tableau 41 : Résumé des valeurs de la concentration en ClO₂, de la température et de la conductivité associées au circuit de référence et aux circuits "essais" de la 3^{ème} phase d'expérimentation.

Traitement	[ClO ₂] ppm moyenne	Quantité ClO ₂ injecté (mg/jour)	Température moyennes °C	Conductivité T0 µS/m (T°C)	Conductivité fin traitement µS/m (T°C)
Référence	/	/	24,49±2,11	325 (21))	332 (26,6)
Continue (0,5 ppm)	0,048±0,007	26,9	24,43±2,2	328 (21)	374 (26,6)
Discontinu 25 mg/jours	0,5±0,01	25	24,5±2,16	332 (21)	385 (26,6)

Lors du traitement continu, la concentration en ClO₂ se situe aux alentours de 0,05 ppm (valeur de concentration ciblée). La moyenne est de 0,048±0,007 ppm et la quantité totale injectée de 26,9 mg/jour (tableau 41). L'écart observé entre la concentration cible (0,05 ppm) et la concentration moyenne (0,048 ppm) pourrait s'expliquer par une valeur très basse, 0,02 ppm, observée à 216 h d'incubation. La suppression de cette valeur du calcul de la moyenne aboutit à une valeur de 0,05 ppm.

La concentration moyenne de ClO₂ lors de traitement discontinu a été de 0,05±0,02 ppm et la quantité totale injectée définie au préalable de 25 mg/jour, injectée en quatre fois (6,25 mg tous les 6 h).

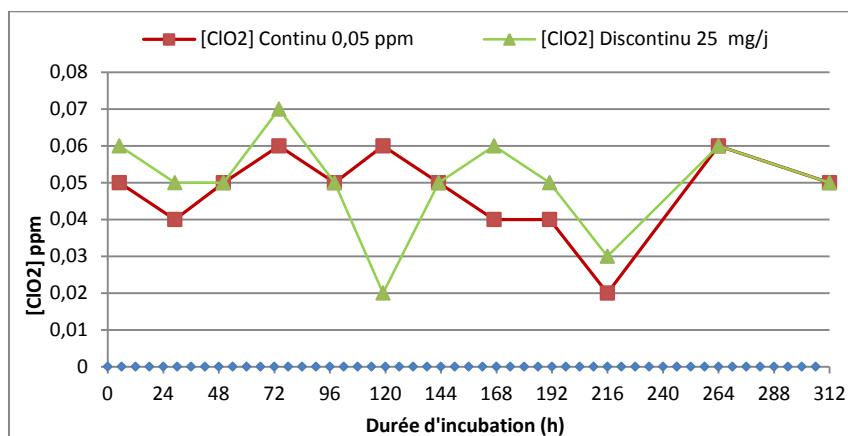


Figure 134 : Evolution des concentrations de ClO₂ au cours d'un traitement continu à 0,05 ppm de ClO₂ (carrés rouges) et d'un traitement discontinu à 25 mg/jour (triangles verts). Les losanges bleus représentent les heures d'injection de ClO₂ lors du traitement discontinu.

Au bilan, aussi bien les valeurs moyennes de la concentration en ClO₂, que les quantités quotidiennes reçues par les bancs traités, se sont avérées très proches (tableau 41). Les différences entre les résultats des traitements devraient donc pouvoir être attribuées au mode d'application du ClO₂.

Par ailleurs, lors de cet essai, l'application des traitements biocides a été prolongée à 312 h au lieu de 144 h (durée d'application des traitements lors des essais précédents). L'objectif étant de mettre en évidence une éventuelle amélioration de l'effet du ClO₂ suite à une exposition prolongée des biofilms.

VI.2.2.4.2 Effet des traitements sur les concentrations des paramètres biologiques du biofilm

VI.2.2.4.2.1 Activité métabolique

La concentration d'ATP dans les biofilms du banc témoin (figure 135) suit une évolution similaire à celle observée dans les essais précédents : une phase de stabilité, ici de l'ordre de 168 h, suivie par une décroissance lente que nous attribuons au développement d'une carence nutritionnelle.

Les concentrations d'ATP dans les biofilms traités baissent dès l'application des traitements. Ce résultat confirme l'efficacité de la concentration de 0,05 ppm de ClO₂ qui est sensiblement la même dans les deux bancs traités, quelle que soit la modalité d'injection. Après 216 h, les deux traitements aboutissent à des concentrations minimales similaires, mais l'abattement des concentrations d'ATP sous l'effet du traitement continu (1,9 pmol) est plus élevé que celui observé sous l'effet du traitement discontinu (1,4 pmol). Cette différence pourrait être justifiée par les différences des quantités totales journalières de ClO₂ injectées, plus élevée dans le cas du traitement continu (respectivement 26,9 ppm et 25 ppm de ClO₂).

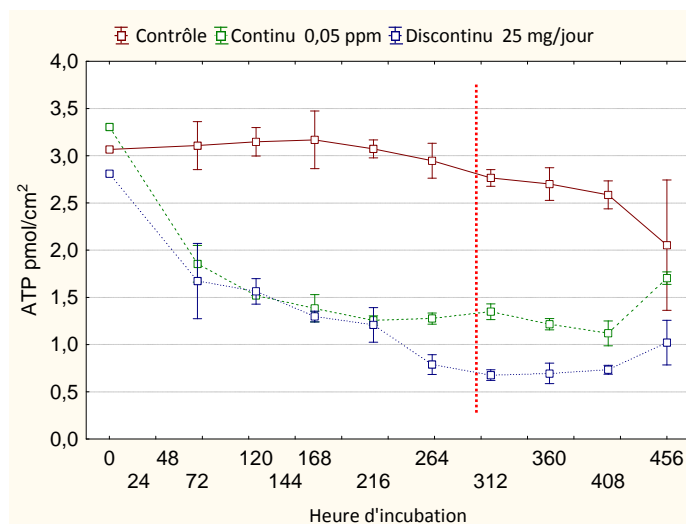


Figure 135 : Evolution de la concentration en ATP (pmol/cm^2) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

Par ailleurs, le prolongement des traitements jusqu'à 312 h fait apparaître une stabilisation des concentrations d'ATP, donc une stagnation de l'effet du traitement continu dans les dernières 144 heures, alors que celui du traitement discontinu continue à s'accroître. Au moment de l'arrêt des traitements, les abattements sont similaires, de l'ordre de $2 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ (de $2,7 \text{ pmol}$ à T0 à $0,6 \text{ pmol}$ à 312 h) pour le traitement continu et de $2,1 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ (de $3,4 \text{ pmol}$ à T0 à $1,4 \text{ pmol}$ à 312 h) pour le traitement discontinu (figure 135). Ces résultats mènent à la conclusion qu'à concentration égale (et pour ce niveau de concentration du ClO_2), les deux modes d'injection aboutissent à la même performance. La comparaison des résultats standardisés pourra nous éclairer d'avantage sur d'éventuels effets du mode d'injection.

L'incubation des échantillons au-delà de l'arrêt des traitements, en vue de l'observation d'éventuels processus de reviviscence, n'a été ici que de 144 h (168 h dans les phases précédentes). Cette période a tout de même été suffisante pour mettre en évidence l'apparition, avec un certain retard (96 h au lieu de 72 h dans les essais équivalents de la phase II), du processus de reviviscence dans le cas des deux traitements (figure 135). L'observation des deux derniers points (408 h et 456 h) montre que les concentrations d'ATP augmentent d'environ $0,6 \text{ pmol}$ dans le cas du traitement continu et d'environ $0,2 \text{ pmol}$ dans le cas du traitement discontinu. Le mode d'application du traitement semble donc avoir un effet sur l'amplitude de la reviviscence mais pas sur le délai de son apparition. La durée de nos enregistrements a cependant été trop courte pour confirmer ce résultat et ainsi, vérifier ou infirmer ce que nous avançons précédemment au sujet de processus de reviviscence proportionnés à l'amplitude de l'effet du biocide.

VI.2.2.4.2.2 Bactéries cultivables

Les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms traités baissent significativement dès l'application des traitements (figure 136). Outre la sensibilité particulièrement nette de cet indicateur aux effets des traitements, il présente la particularité d'être pour eux discriminant. Le traitement discontinu apparaît ainsi significativement plus efficace que le traitement continu.

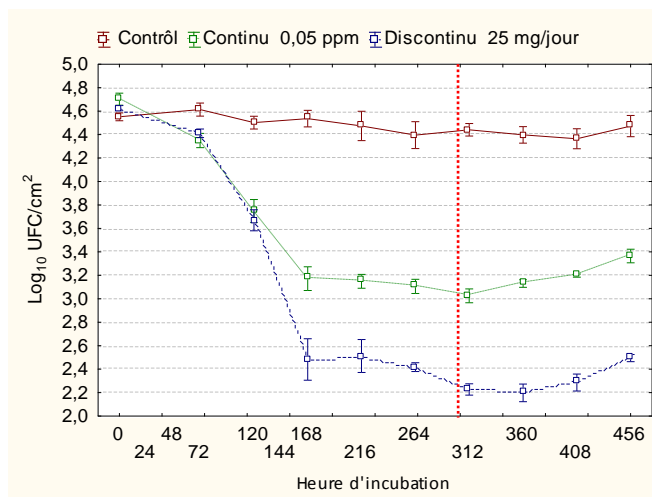


Figure 136 : Evolution de la concentration des bactéries cultivables (Log_{10} UFC/cm²) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

Pour la même durée d'application de 168 h, le traitement discontinu aboutit à un abattement d'environ 2,2 Log alors qu'il n'est que de 1,2 Log avec le traitement continu. De plus, comme dans le cas de la concentration en ATP, l'effet du traitement discontinu se poursuit faiblement jusqu'à son arrêt, tandis que celui du traitement continu ne progresse plus significativement au-delà de 168 h d'incubation. Il est clair, cependant, que dans les deux cas, l'effet principal est obtenu dans les 168 premières heures du temps de contact.

Comme dans le cas de l'ATP, l'arrêt des traitements aboutit à une augmentation de la concentration des bactéries cultivables qui est immédiate dans le cas du traitement continu et différée de 48 h dans le cas du traitement discontinu (figure 136). On note par ailleurs que les pentes et l'amplitude du phénomène (0,4 Log environ) semblent être les mêmes dans les deux cas. La période d'observation trop courte ne permet pas d'apprécier objectivement l'amplitude de ces phénomènes de reviviscences à long terme.

Nous avons donc ici la démonstration d'un gain en efficacité apportée par une injection discontinue du ClO_2 en termes d'efficacité, de prolongation de l'effet biocide et du retard d'apparition de la reviviscence.

VI.2.2.4.2.3 Bactéries totales

L'évolution des concentrations des bactéries totales est présentée dans la figure 137. Les deux traitements apparaissent équivalents tant du point de vue du temps de latence nécessaire pour l'apparition d'un effet significatif (72 h environ), que de l'abattement de la concentration des cellules qui est de 0,45 Log après 312 h d'incubation.

Cet indicateur fait apparaître également un gain d'efficacité suite à la prolongation du traitement. En effet l'abattement des bactéries totales était de 0,1 Log après 144 h d'incubation (0,2 Log lors de la phase II, à la même concentration) alors qu'il est de 0,45 Log après 312 h d'incubation.

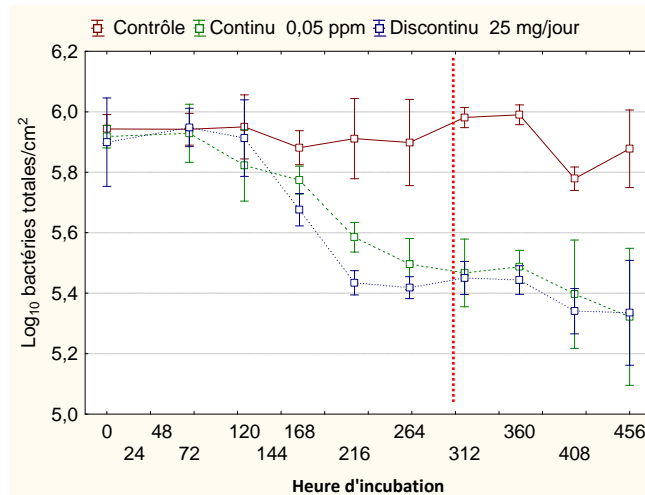


Figure 137 : Evolution de la concentration des "bactéries totales" (Log_{10} bact tot/cm²) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

La seconde originalité est qu'aucun phénomène de reviviscence n'a pu être observé durant le temps de l'expérience. Comme indiqué précédemment, ces résultats sont sans doute à imputer tout à la fois à l'inertie de l'indicateur, à la technique de dénombrement employée et au fait qu'à la concentration de 0,05 ppm de ClO₂, l'intégrité physique de la plupart des cellules n'est pas immédiatement touchée. La prolongation de la durée d'application de ce traitement a donc permis d'améliorer sa performance vis-à-vis des bactéries totales.

VI.2.2.4.2.4 *Legionella pneumophila*

Comme lors des autres phases, aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'a été détectée. Les dénombrements de *L. pneumophila* totales ont, là encore, été très 'bruités' (incertitudes élevées) sans doute en conséquence des effets de masque des particules auxquelles les bactéries étaient associées dans les biofilms (figure 138). Les résultats ne permettent donc pas de faire la démonstration d'un effet significatif des traitements. En faisant abstraction des incertitudes, il semble que l'ensemble des points s'inscrivent dans une tendance à la baisse des valeurs jusqu'à des échantillons dans lesquels *L. pneumophila* est indétectable, ceci même dans le cas du biofilm non traité.

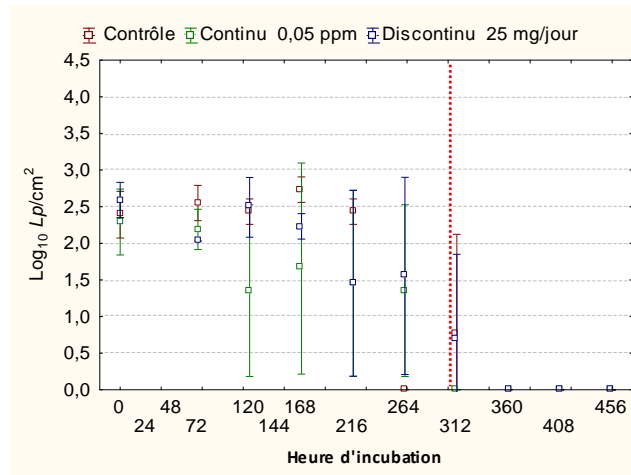


Figure 138 : Evolution de la concentration des *L. pneumophila* totales" ($\text{Log}_{10} Lp \text{ tot}/\text{cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

VI.2.2.4.2.5 Amibes

Comme dans le cas des légionelles, les valeurs de la concentration des amibes sont, pour la plupart, associées à de très fortes incertitudes (figure 139). Leur évolution dans le banc soumis au traitement continu est similaire à celle du banc témoin. Seules quelques valeurs du banc soumis au traitement discontinu s'avèrent significativement différentes de celles des deux autres bancs, mais seulement dans une phase intermédiaire du temps d'incubation. Au terme du traitement (à 312 h), les valeurs des deux bancs traités sont identiques.

Aucune manifestation d'une reviviscence des populations amibiennes n'a été enregistrée. Les concentrations des amibes dans tous les biofilms diminuent à la fin de cette essai, elles deviennent indétectables dès 408 h d'incubation (témoin compris).

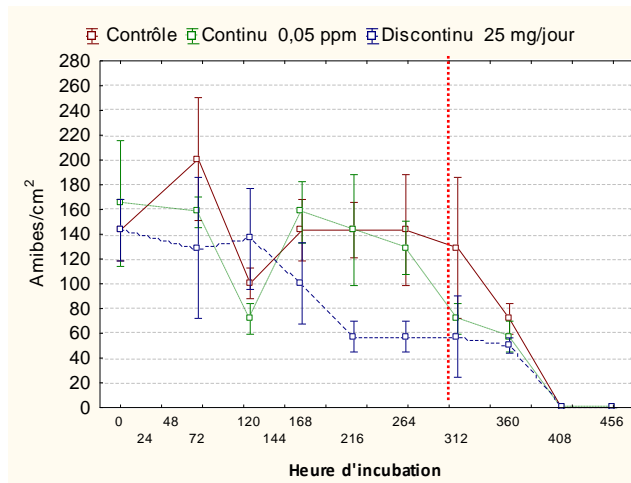


Figure 139 : Evolution de la concentration des amibes ($\text{amibes}/\text{cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.

En conclusion

Lors de cette 3^{ème} phase d'expérimentation, les bancs essais ont été exposés à des concentrations de ClO₂ très proches, de l'ordre de 0,05 ppm et différaient donc essentiellement par le mode d'injection, continu dans un cas (associé à une concentration moyenne de 0,048 ppm), discontinu à raison de 4 injections par jour dans l'autre cas (associé à une concentration moyenne de 0,05 ppm). Il est donc possible de comparer les résultats sur le plan du mode d'injection :

- en termes d'efficacité, c'est le traitement discontinu qui apparait le plus performant vis-à-vis des bactéries cultivables ;
- en termes de cinétique de développement de l'effet du biocide : l'évolution de la concentration en ATP et celle de la concentration des bactéries cultivables semblent indiquer que l'effet du traitement discontinu se poursuit jusqu'à la fin de son application alors que le traitement continu aboutit à un plateau (stagnation de l'effet du traitement);
- la confirmation de l'induction du processus de reviviscence par les traitements. Il n'a cependant pas été possible de relier l'amplitude du phénomène à celle de l'effet des traitements, du fait que la période d'observation avait été raccourcie au profit de la période de traitement. Par ailleurs, dans le cas des bactéries cultivables, l'apparition de la reviviscence est immédiate après l'arrêt du traitement continu et différée de 48 h sous l'effet du traitement discontinu.

Remarque concernant la détection des légionelles

La détection des légionelles cultivables a été impossible lors des 3 phases d'expérimentation. Celle des légionelles totales (par immunofluorescence) a plutôt été associée à de fortes incertitudes. Dans les deux cas et pour les 3 phases expérimentales aucune conclusion n'a pu être avancée sur l'effet de ces traitements vis-à-vis des légionelles.

Concernant les formes cultivables nous avons trouvé un résultat plus ou moins similaire lors des essais Perox. En effet lors de ces essais, très peu de Lp cultivables ont été détectées, néanmoins on a pu mettre en évidence la performance du traitement H₂O₂ (50 ppm)-UV vis-à-vis de Lp cultivables.

Concernant les Lp totales les résultats des essais Securox et Perox sont contradictoires. En effet, lors des essais Perox les Lp totales ont systématiquement été détectées et on a pu mettre en évidence les effets des différents traitements.

Les résultats obtenus lors des essais Securox : absence de Lp cultivables et les mesures bruitées des Lp totales peuvent être attribués aux modifications apportées au niveau de la démarche expérimentale :

- diminution de la phase d'incubation dans la source soufre : 10 jours pour les essais Securox et 15 jours pour les essais Perox ;
- Absence d'un apport nutritionnel lors des essais Securox alors que des ajouts réguliers de matières organiques ont été effectués lors des essais Perox ;
- La température de l'eau de recirculation n'a pas été régulée lors des essais Securox et a été par conséquent soumise aux variations de température atmosphérique. La température de l'eau de recirculation lors de ces essais a systématiquement été plus faible que celle des essais Perox, régulée à environ 28°C par un thermoplongeur.

Tous ces paramètres semblent influencer les concentrations des différents indicateurs des biofilms et notamment des légionelles, qui ont été le plus souvent plus faibles lors des essais Securox. Par exemple les concentrations moyennes des Lp totales (tous essais confondus) à l'issue de la phase d'adaptation (T0) étaient de $3,5 \pm 0,5 \text{ Log}_{10}$ lors des essais Perox et de $2,4 \pm 0,4 \text{ Log}_{10}$ lors des essais Securox (tableau 23 et 42). Ces paramètres ont également pu jouer sur l'évolution des

concentrations des différents indicateurs lors des essais Securox, une tendance à la baisse de leurs concentrations à d'ailleurs été observée au cours des traitements même pour les biofilms non traités, probablement en rapport avec une carence nutritionnelle. Ces données expliqueraient l'absence de Lp cultivables et les mesures bruitées des Lp totales et des amibes lors des essais Securox.

VI.2.3 Standardisation des résultats

La standardisation des résultats a été discutée dans le chapitre précédent. La comparaison de l'efficacité des différents traitements testés (selon la modalité d'injection, la concentration de ClO₂, et la quantité totale injectée) nécessite en effet une standardisation des résultats obtenus. Les essais de traitement ont été réalisés lors de 3 expériences indépendantes. Durant ces expériences, les concentrations initiales des paramètres biologiques sont variables. Le tableau 42 présente les concentrations de ces paramètres au début de l'analyse et avant le lancement des traitements (T0).

La standardisation des valeurs obtenues a donc été réalisée en prenant en compte :

- 1- Les écarts entre les valeurs du témoin (Tem_{T0}) et de l'essai (Ess_{T0}) à T0 : cet écart a été pris en compte pour le calcul des valeurs du témoin standardisé Tem_{stand} à chaque prélèvement

$$\text{Tem}_{\text{stand}(T)} = \text{Tem}_T - (\text{Tem}_{T0} - \text{Ess}_{T0})$$

T : date de prélèvement

- 2- L'évolution du témoin au cours de l'essai :

$$\text{Ess}_{\text{stand}(T)} = E_T / \text{Tem}_{\text{stand}(T)}$$

T : date de prélèvement

Le rapport obtenu qui varie de 0 à 1, représente donc le pourcentage des concentrations résiduelles des paramètres analysés sous l'effet du traitement, par rapport à la concentration de la référence du même essai et au même temps de prélèvement. Par cette standardisation, on s'affranchit :

- des biais apportés par les écarts entre les valeurs de référence (biofilms non traités) et les valeurs de l'essai (biofilms traités) à T0,
- de l'évolution des valeurs de référence au cours de l'essai
- et des différences des valeurs initiales observées entre les différents essais.

Seul l'essai de traitement continu à 0,05 ppm de ClO₂ a été répété deux fois. Les autres essais n'ont été réalisés qu'une seule fois. Lors du deuxième essai à 0,05 ppm, la durée d'application du traitement a été prolongée. De ce fait les résultats de ces deux essais sont présentés séparément afin de montrer d'éventuels effets de cette prolongation. Les mesures ont été réalisées en triplicat, les points et les barres d'erreur présentées dans les graphiques ci-dessous représentent respectivement les moyennes et les écarts types de 3 mesures. Seuls les résultats des trois indicateurs pour lesquels des effets significatifs des traitements ont été observés sont présentés ci-dessous (ATP, bactéries cultivables et bactéries totales).

Tableau 42 : Concentrations des paramètres biologiques des biofilms analysés à T0

Traitement	ATP pmol/Cm ²		Bactéries cultivables Log ₁₀ UFC/cm ²		Bactéries totales Log ₁₀ (N) /cm ²		Lp totales Log ₁₀ (N)/cm ²		Lp cultivables Log ₁₀ UFC/cm ²		Amibes N/cm ²	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai
Continu 0,1 ppm	1,68	1,39	4,4	4,21	6,33	6,20	2,75	1,88	/	/	179	143
Continu 0,05 ppm	2,40	2,34	4,65	4,48	5,85	5,97	2,73	3,19	/	/	71	121
Continu 0,05 ppm (essai 2)	3,07	3,3	4,55	4,70	5,94	5,89	2,39	2,2	/	/	143	164
Discontinu 10 mg/jour	1,68	1,51	4,40	4,35	6,33	6,23	2,75	2,3	/	/	179	129
Discontinu 25 mg/jour	3,07	2,81	4,55	4,36	5,94	6,04	2,39	2,50	/	/	79	114
Discontinu 50 mg/jour	2,4	2,2	4,65	4,28	5,85	5,80	2,73	2,79	/	/	71	114
Ecart Type	0,6	0,7	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5			52,9	19,6

VI.2.3.1 Comparaison de la performance du procédé SECUROX selon la concentration de ClO₂ injecté en continu

Deux concentrations de ClO₂ ont été testées par traitement continu : 0,1 et 0,05 ppm. L'objectif de cette comparaison est de comparer les performances de la concentration de 0,05 ppm à celles de la concentration 0,1 ppm préconisée par le fournisseur de ClO₂ et appliquée dans les installations en grandeur réelle. Le tableau 43 résume les principales caractéristiques des circuits "essais" lors des deux traitements.

Tableau 43 : Résumé des valeurs de la concentration en ClO₂, de la température et de la conductivité associées aux circuits "essais" lors des traitements continus à 0,1 et 0,05 ppm de ClO₂

Traitement Continu	[ClO ₂] ppm moyenne	Quantité ClO ₂ injecté (mg/jour)	Température moyennes °C	Conductivité T0 μS/m (T°C)	Conductivité fin traitement μS/m (T°C)
0,1 ppm	0,11 ±0,03	50,83	22,2±1,2	270 (21,9)	295 (22)
0,5 ppm (I)	0,046±0,016	27,8	25,01±1,56	301 (27)	290 (23)
0,5 ppm (II)	0,048±0,007	26,9	24,43±2,2	328 (21)	374 (26,6)

Les évolutions des concentrations standardisées de l'ATP (figure 140-A) des bactéries cultivables (figure 140-B) et des bactéries totales (figure 140 C) sont présentées dans la figure 140.

Ces indicateurs apportent la démonstration d'une meilleure efficacité de la concentration de 0,1 ppm en termes d'abattement des concentrations mais aussi du point de vue du temps de latence nécessaire pour l'apparition de l'effet des traitements sur les bactéries totales. Ce délai est en effet de 72 h à 0,1 ppm et de 120 h à 0,05 ppm de ClO₂. Quel que soit l'indicateur pris en compte, la prolongation du traitement à 0,05 ppm de ClO₂ a permis d'améliorer sa performance sans pour autant aboutir à la performance obtenu avec 0,1 ppm. Son effet se poursuit jusqu'à son arrêt et aucun plateau n'a été observé.

L'apparition du processus de reviviscence, observée uniquement pour l'ATP et les bactéries cultivables est immédiate après l'arrêt des traitements. La prolongation du traitement continu à 0,05 ppm jusqu'à 312 h ne semble pas avoir d'impact sur le délai d'apparition de ce phénomène. L'amplitude de ce dernier est nettement plus élevée après l'arrêt du traitement à 0,1 ppm, suggérant qu'une meilleure efficacité initiale du traitement est associée à une reviviscence plus élevée pour cette modalité d'injection.

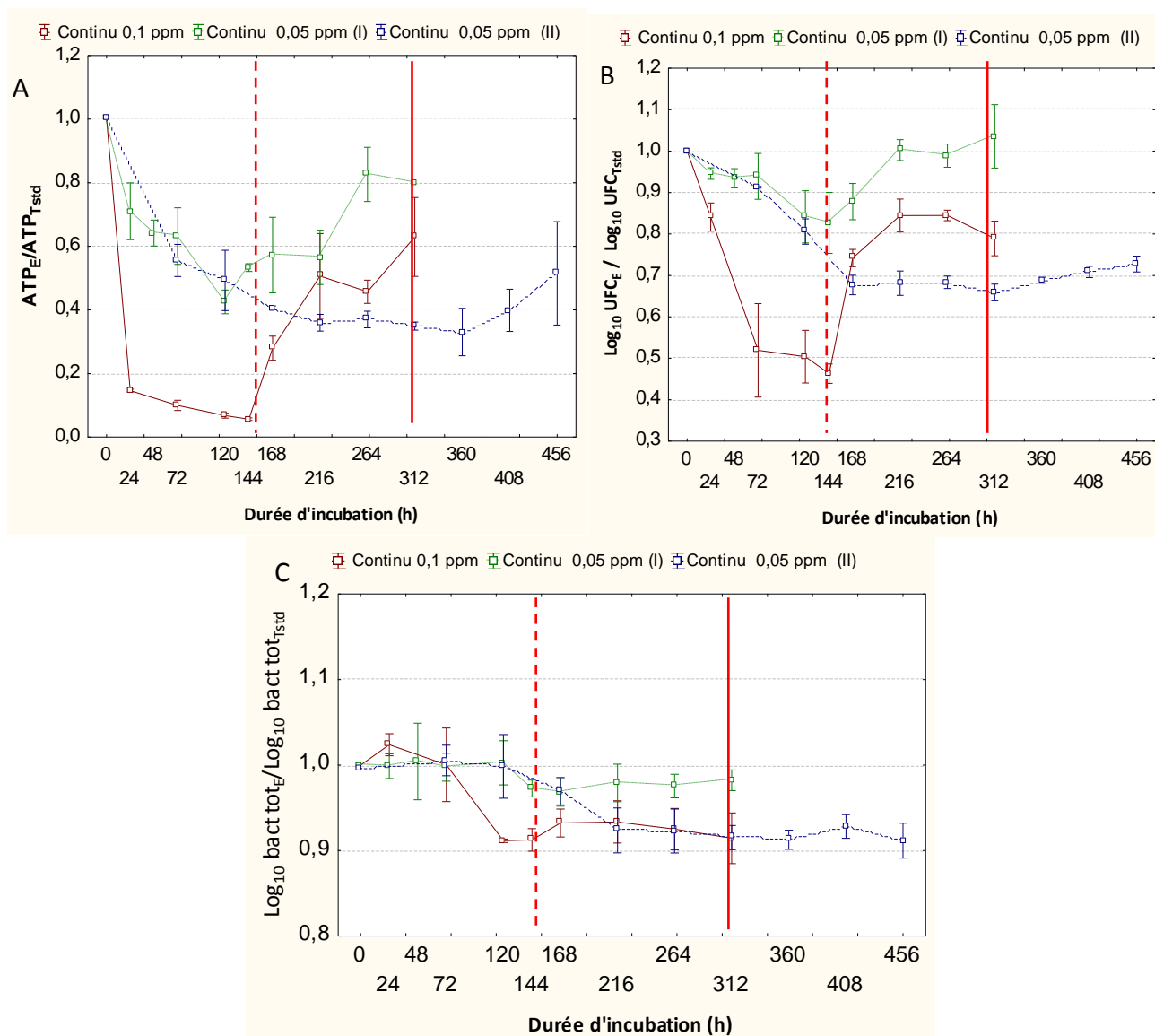


Figure 140 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin dans les biofilms traités en continu à 0,1 ppm (courbe rouge) et 0,05 ppm (courbe verte : essais 1, courbe bleue : essai 2) de ClO₂. La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements continu à 0,1 ppm et 0,05 ppm (essai 1), la ligne continue rouge représente l'arrêt du traitement continu à 0,05 ppm (essai 2).

En conclusion

La comparaison de l'effet des deux concentrations, 0,1 et 0,05 ppm, associées à une injection en continu de ClO₂, confirme le fait que la performance du ClO₂ appliqué en continu est proportionnelle à sa concentration.

Quelle que soit la concentration de ClO₂ testée les concentrations de ces indicateurs se stabilisent après un certain temps d'application et ce, malgré la poursuite de l'application des traitements.

La prolongation du traitement à une même concentration (0,05 ppm) permet néanmoins d'améliorer la performance du traitement mais ne prévient pas le phénomène de reviviscence. Son amplitude est proportionnelle à l'efficacité initiale du traitement tout au moins dans les conditions testées ici.

VI.2.3.2 Comparaison de la performance du procédé SECUROX selon la quantité de ClO₂ injectée en discontinu

Trois valeurs d'injection quotidienne de ClO₂ ont été testées lors des traitements discontinus : 10 mg/jour et 25 mg/jour et 50 mg/jour. Ces traitements discontinus ont été testés dans la perspective de réduire les quantités totales de ClO₂ injectées. Les principales caractéristiques physicochimiques des circuits lors de ces essais, sont rappelées dans le tableau 44.

Tableau 44 : Evolution des paramètres physicochimiques ([ClO₂], température et conductivité) lors des traitements discontinus à 10, 25 et 50 mg/jour de ClO₂

Traitement discontinu	[ClO ₂] ppm moyenne	Quantité ClO ₂ injecté (mg/jour)	Température moyennes °C	Conductivité T0 μS/m (T°C)	Conductivité fin traitement μS/m (T°C)
10 mg/jours	0,035±0,015	10	22,3±1,3	270	288
25 mg/jours	0,05±0,01	25	24,5±2,16	332 (21)	385 (26,6)
50 mg/jour	0,10±0,02	50	25,18±1,54	300 (27)	298 (23)

L'évolution des concentrations standardisées d'ATP (figure 141-A), des bactéries cultivables (figure 141-B) et des bactéries totales (figure 141-C) confirment l'inefficacité du traitement discontinu à 10 mg/j. Une stagnation de l'effet du traitement n'est observée qu'à 50 mg/j et uniquement pour l'ATP. Pour les bactéries cultivables, ce plateau est moins flagrant, l'inactivation semble se poursuivre, mais à faible pente, jusqu'à l'arrêt du traitement. Cependant, leurs concentrations ne semblent pas significativement différentes à partir de 72 h et jusqu'à l'arrêt du traitement, l'effet principale étant observé entre 0 et 72 h. Enfin, aucun plateau n'est observé pour les bactéries totales.

Ces résultats apportent une information originale qui concerne les trois indicateurs : la prolongation du traitement discontinu à 25 mg/j aboutit à une efficacité similaire à celle du traitement à 50 mg/j. En effet, le traitement discontinu à 50 mg/j conduit à un plateau (ATP et bactéries cultivables) et semble atteindre son efficacité maximale à 72 h. Aucun effet significatif n'est observé de 72 h à 144 h.

Ce résultat n'a pas été obtenu avec les traitements continus. Certes, la prolongation du traitement continu à 0,05 ppm améliore son efficacité mais n'atteint jamais l'efficacité du traitement continu à 0,1 ppm. Pourtant, les quantités de ClO₂ injectées lors des traitements continus à 0,1 ppm et 0,05 ppm sont similaires à celles injectées lors des traitements discontinus à 50 et 25 mg/j, respectivement. Ces résultats sont donc attribuables à la modalité d'injection discontinue. Il faut noter ici, que quel que soit leur efficacité, aucun traitement ne conduit à une éradication complète des biofilms.

Le phénomène de reviviscence apparait, pour les traitements qui se sont avérés efficaces, immédiatement après leur arrêt (pour l'ATP et les bactéries cultivables). L'amplitude de cette reviviscence est plus faible lors du traitement à 25 mg/j. De ce fait, nous ne pouvons pas associer l'efficacité des traitements à l'amplitude de la reviviscence comme cela a été le cas lors des traitements continus. C'est donc l'association d'une injection discontinue et d'une durée d'application prolongée qui aurait engendré une diminution de l'amplitude de la reviviscence lors du traitement discontinue à 25 mg/j.

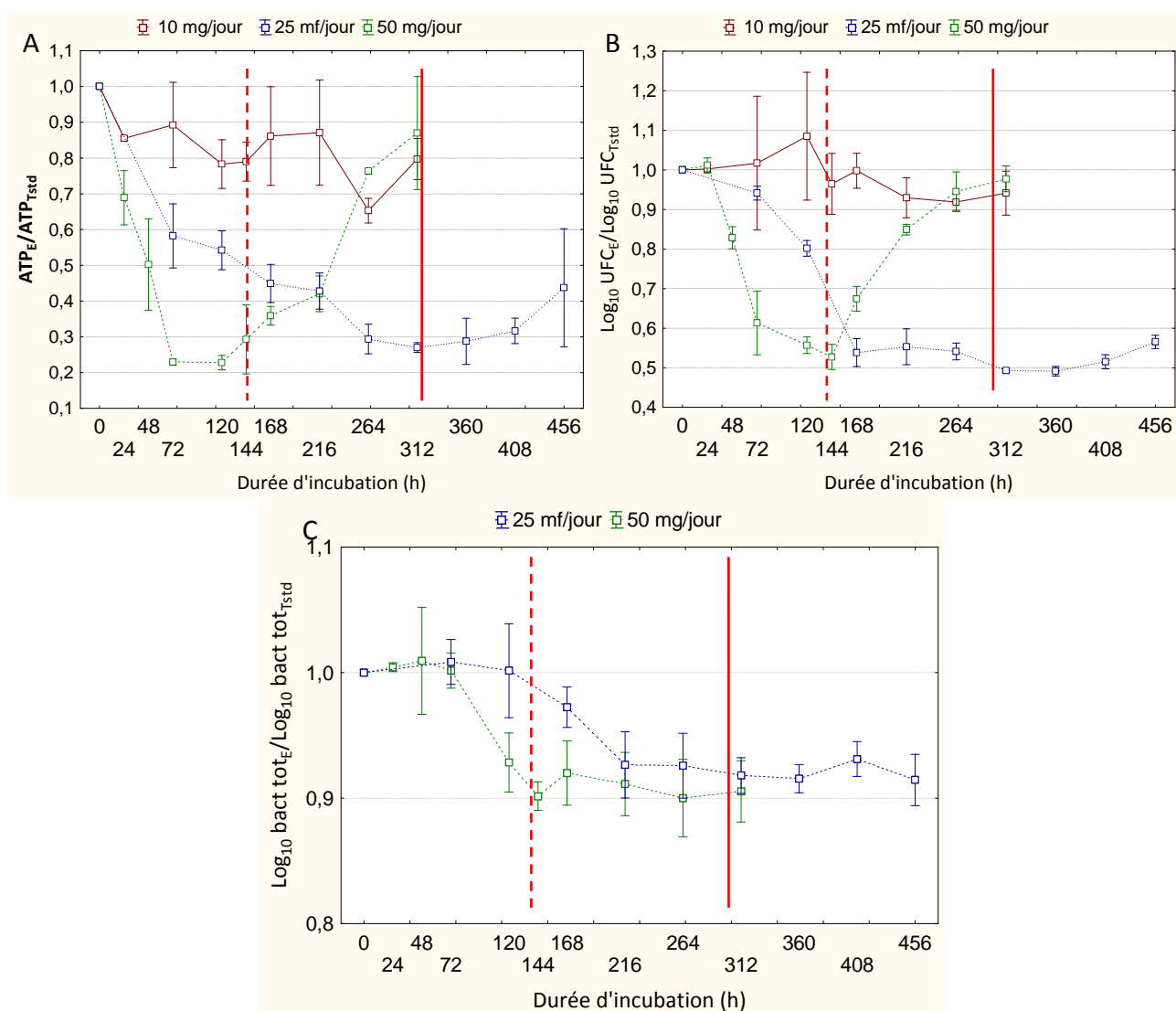


Figure 141 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin dans les biofilms traités à 10 mg/jour (courbe rouge), 50 mg/jour (courbe verte) et 25 mg/jour (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements discontinus à 10 et 50 mg/j, la ligne continue rouge représente l'arrêt du traitement discontinu à 25 mg/j.

En conclusion

La comparaison des effets des trois quantités de ClO₂ (10, 25 et 50 mg/j) appliquées par injection discontinue apporte les informations suivantes :

- l'inefficacité de l'injection discontinue de 10 mg/j vis-à-vis des indicateurs étudiés ;
- une relation de proportionnalité entre l'efficacité du traitement par injection discontinue et la quantité totale de ClO₂ injectée, pour une durée d'application de 144 h ;
- la prolongation de l'injection discontinue de 25 mg/j jusqu'à 312 h aboutit à la même performance que l'injection de 50 mg/j qui semble atteindre son effet maximal dès 72 h d'application. Sur un plan opérationnel, même si à 50 mg/j l'effet est plus rapide, 25 mg/j suffisent et permettent d'économiser 50 % de la quantité totale injectée de ClO₂ ;
- la réduction de l'amplitude de la reviviscence avec la prolongation du traitement discontinu à 25 mg/j. L'association d'une reviviscence d'amplitude élevée avec une efficacité initiale élevée, observée dans le cas des traitements continus, ne l'est pas pour le traitement discontinu.

VI.2.3.3 Comparaison de la performance du procédé SECUROX selon la modalité d'injection d'une même quantité de ClO₂

Les variations de performance d'une même quantité totale de ClO₂ injectée en fonction de la modalité d'injection ont été comparées. La comparaison porte sur les essais à 0,1 ppm et 50 mg/j d'un part et à 0,05 ppm et 25 mg/j d'autre part. Nos résultats montrent en effet que les quantités de ClO₂ totales injectées (et les concentrations dans le circuit), lors des essais de traitements continus à 0,1 ppm et 0,05 ppm, sont similaires aux quantités injectées lors des essais de traitements discontinus à 50 mg/j et 25 mg/j, respectivement (tableau 45).

Tableau 45 : Concentrations moyennes et quantités totales de ClO₂ injectées quotidiennement.

Traitement	Continu (0,1 ppm)	Continu (0,05 ppm) (I)	Continu (0,05ppm) (II)	Discontinu 50 mg/jour	discontinu 25 mg/jours
[ClO ₂] ppm moyenne	0,11 ±0,03	0,046±0,016	0,048±0,007	0,102±0,02	0,5±0,01
Quantité ClO ₂ injecté (mg/jour)	50,83	27,8	26,9	50	25

VI.2.3.3.1 Comparaison d'un traitement continu à 0,05 ppm avec un traitement discontinu à 25 mg/j

L'analyse des résultats standardisés des trois indicateurs (figure 142 A, B et C) apporte la confirmation du fait que la prolongation du traitement continu à 0,05 ppm de 144 h à 312 h améliore sa performance qui reste cependant inférieure à celle du traitement continu à 0,1 ppm.

Les résultats concernant les bactéries cultivables (figure 142 B) montrent également que le traitement discontinu est légèrement plus performant que le traitement continu (concentrations moyennes et quantités injectées similaires). Concernant l'ATP et les bactéries totales (figure 142 A et C) leurs performances sont identiques.

Du point de vue de la reviviscence, pour une même durée d'incubation, les deux modalités d'injection aboutissent à une amplitude similaire. La prolongation de la durée de traitement à 312 h permet, là aussi, de diminuer l'amplitude du phénomène par rapport à celle obtenue après 144 h de traitement, même si la durée d'enregistrement dans le premier cas, a été plus courte.

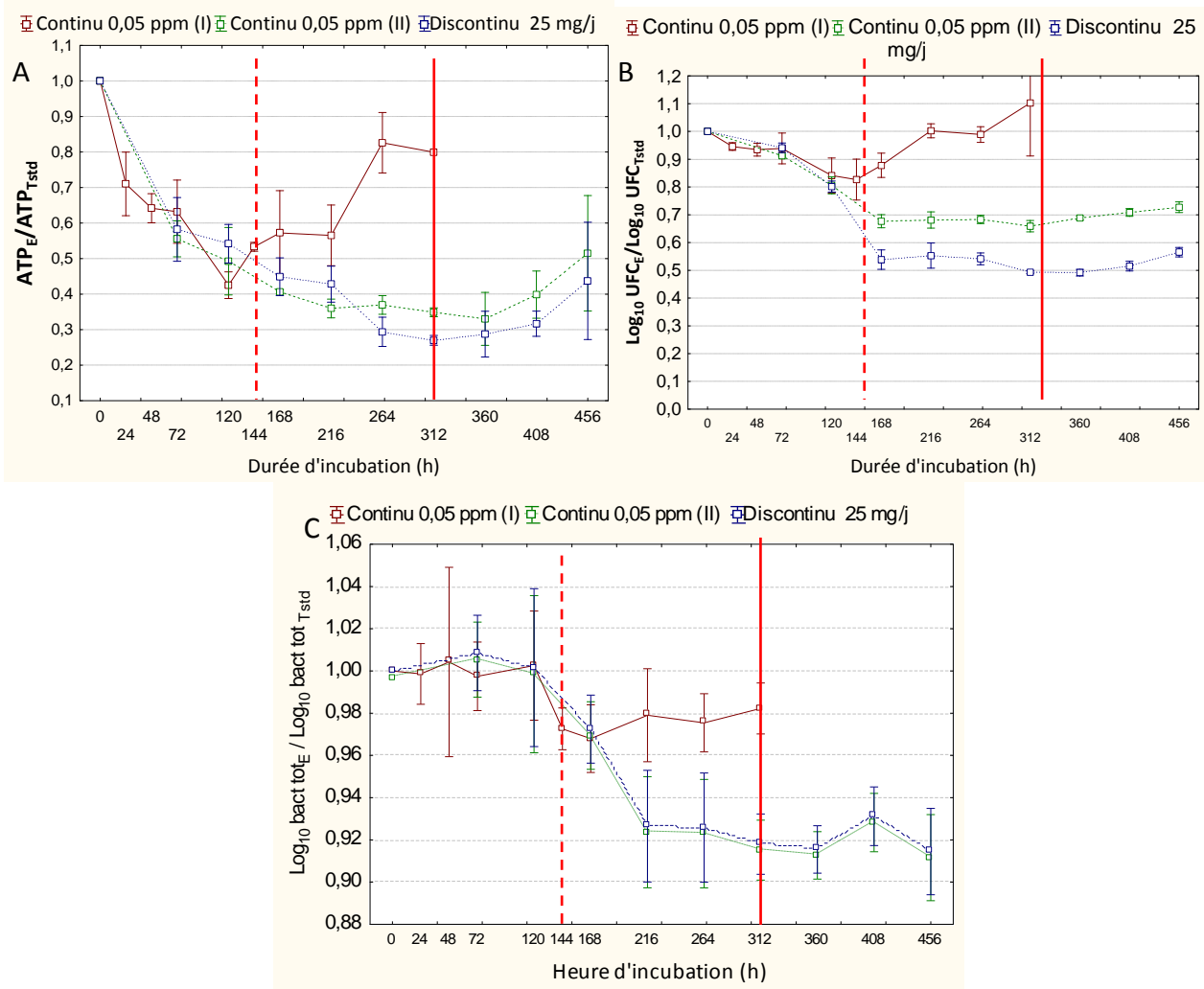


Figure 142 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin dans les biofilms traités par un traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue) et un traitement continu (courbe rouge : essai I et verte : essai II). La ligne rouge pointillée représente l'arrêt du traitement continu à 0,05 ppm (essai I), la ligne rouge continue représente l'arrêt des traitements continu à 0,05 ppm (essai II) et discontinu.

VI.2.3.3.2 Comparaison d'un traitement continu à 0,01 ppm avec un traitement discontinu à 50 mg/j

Les résultats de l'ATP (figure 143-A) et des bactéries cultivables (figure 143-B) apportent une information contradictoire à celle présentée dans le paragraphe précédent. Ces résultats montrent en effet que le traitement continu à 0,1 ppm apparaît plus performant que le traitement discontinu à 50 mg/j alors que pour ces deux traitements, les quantités de ClO₂ injectées sont similaires. Les traitements aboutissent à la même performance vis-à-vis des bactéries totales (figure 143-C). Le processus de reviviscence apparaît dès leur arrêt et son amplitude semble être similaire pour les 2 conditions testées ici.

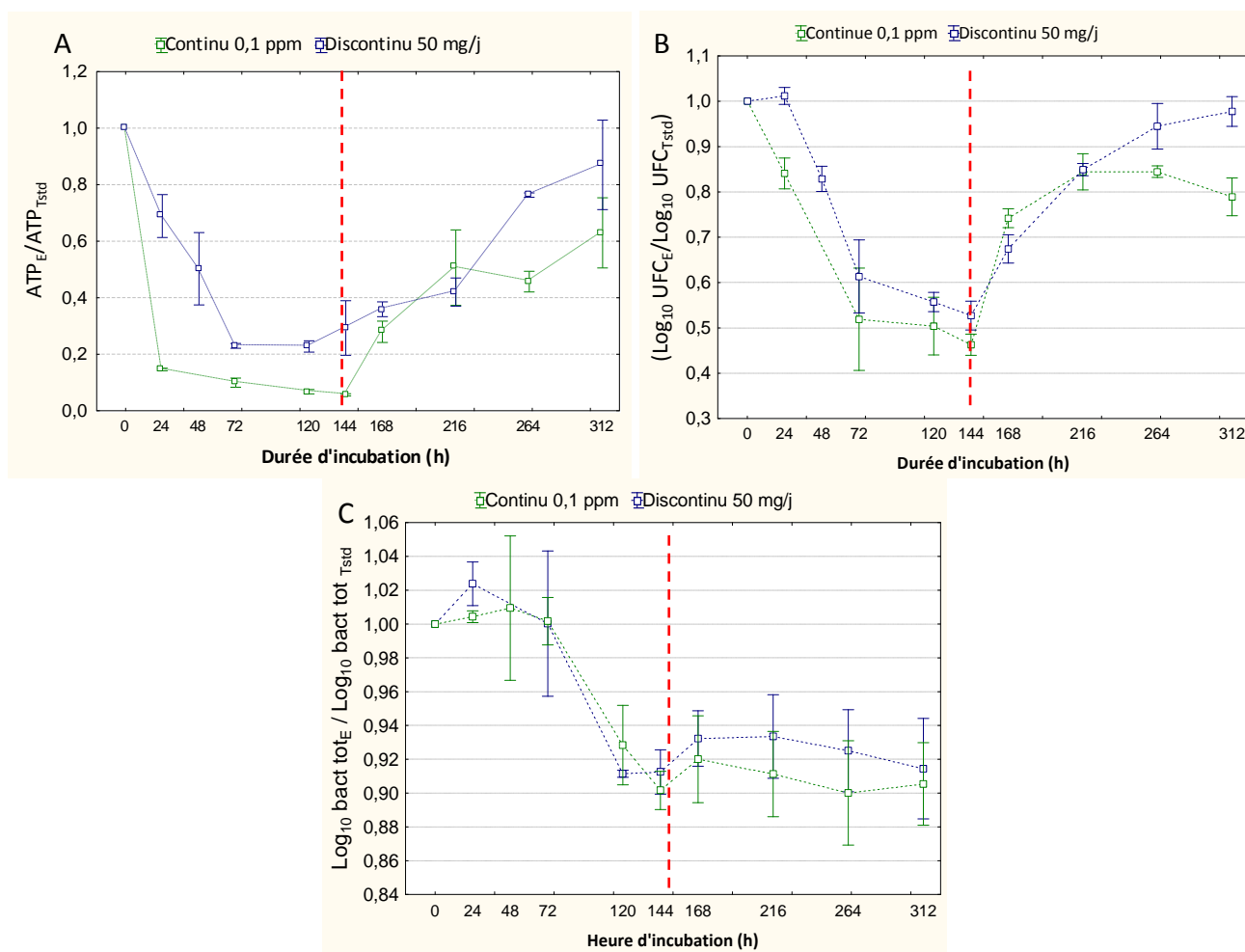


Figure 143 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin dans les biofilms traités par un traitement discontinu à 50 mg/j (courbe bleue) et un traitement continu à 0,1 ppm (courbe verte). La ligne rouge pointillée représente l'arrêt des traitements.

En conclusion

La comparaison des performances des deux modalités d'injection, continue et discontinue, à des concentrations et quantités de ClO₂ similaires, apporte donc l'information principale suivante :

- à faible dose (0,05 ppm), l'injection discontinue paraît plus efficace que l'injection continue ;
- à forte dose (0,1 ppm) la tendance est inversée et l'injection continue apparaît plus performante.

On note également que quelle que soit la modalité d'injection, la prolongation de la durée d'application permet d'améliorer les performances des traitements biocides.

VI.2.4 Synthèse des performances des traitements biocides

Les performances des différents traitements biocides au ClO₂ sont comparées ici en termes d'efficacité et en termes de reviviscence. Du point de vue de la reviviscence, seuls sont comparés l'activité métabolique (ATP) et la concentration des bactéries cultivables.

VI.2.4.1 En termes d'efficacité

Les tableaux 46, 47 et 48 présentent les performances de l'ensemble des traitements testés, en termes d'efficacité du point de vue de l'ATP, des bactéries cultivables et des bactéries totales, respectivement.

Tableau 46 : Comparaison de l'efficacité des traitements biocides au ClO₂ du point de vue de l'ATP (résultats standardisés, %).

	Durée d'application	% ATP éliminé (*)	Temps (h) (*)	Vitesse d'élimination % ATP/h (*)
Continu 0,1 ppm	144	85	24	3,56
Continu 0,05 ppm (I)	144	48	120	0,40
Continu 0,05 ppm (II)	312	50 (64*)	144 (216*)	0,30 (0,42*)
Discontinu 10 mg/j	144	-	-	-
Discontinu 25 mg/j	312	46 (73*)	144 (216*)	0,34 (0,4*)
Discontinu 50 mg/j	144	77	72	1,07

(*) Résultats obtenus après prolongation du traitement à 312 h

Pour une meilleure visibilité des effets des traitements biocides vis-à-vis des bactéries cultivables et totales il est nécessaire de prendre en compte le Log₁₀ des concentrations (tableaux 47 et 48).

Tableau 47 : Comparaison de l'efficacité des traitements biocides au ClO₂ du point de vue des bactéries cultivables (Log₁₀ UFC)

	Durée d'application	Concentration initiale (Log ₁₀ UFC/cm ²)	Concentration minimale (Log ₁₀ UFC/cm ²) (*)	Log éliminés (Log ₁₀ UFC/cm ²) (*)	Temps nécessaire (h) (*)	vitesse d'éliminations (Log/h) (*)
Continu 0,1 ppm	144	4,21	1,95	2,26	120	0,02
Continu 0,05 ppm (I)	144	4,48	3,54	0,94	120	0,008
Continu 0,05 ppm (II)	312	4,70	3,75 (3,17 *)	0,96 (1,54*)	120 (168*)	0,008 (0,01*)
Discontinu 10 mg/j	144	4,35	-	-	-	-
Discontinu 25 mg/j	312	4,63	3,67 (2,48*)	0,97 (2,15*)	120 (168*)	0,008 (0,013*)
Discontinu 50 mg/j	144	4,28	2,24	2,05	120	0,017

(*) Résultats obtenus après prolongation du traitement à 312 h

Tableau 48 : Comparaison de l'efficacité des traitements biocides au ClO₂ du point de vue des bactéries totales (Log₁₀ bactéries totales)

	Durée d'application	Concentration initiale	Valeur Minimal (*)	Log Éliminé (*)	Heure (*)	Vitesse d'élimination (Log/h) (*)
Continu 0,1 ppm	144	6,33	5,58	0,75	144	0,01
Continu 0,05 ppm (I)	144	5,96	5,79	0,18	144	0,0012
Continu 0,05 ppm (II)	312	5,92	5,77 (5,45*)	0,14 (0,45*)	144 (312*)	0,001(0,002*)
Discontinu 10 mg/j	144	-	-	-	-	-
Discontinu 25 mg/j	312	5,90	5,53 (5,23*)	0,37 (0,67*)	144 (312*)	0,002(0,002*)
Discontinu 50 mg/j	144	5,94	5,35	0,59	144	0,0041

(*) Résultats obtenus après prolongation du traitement à 312 h

Les données présentées dans ces tableaux permettent de définir avec précision une hiérarchie en termes d'efficacité du ClO₂ en fonction de la concentration, de la quantité totale de ClO₂ injectée par jour et du point de vue de la modalité d'injection.

Le traitement continu à 0,1 ppm apparaît le plus performant vis-à-vis de l'ATP et des bactéries cultivables mais aussi des bactéries totales. Ce traitement permet d'éliminer plus de 85% de l'ATP en 24 h, 2,26 Log de bactéries cultivables en 120 h et 0,75 Log de bactéries totales en 144 h. Aucun autre traitement n'aboutit à cette performance, même le traitement discontinu à 50 mg/j pour lequel, rappelons le, la quantité totale injectée et les concentrations moyennes de ClO₂ sont similaires à celles du traitement continu à 0,1 ppm. Les vitesses d'élimination de l'ATP, des bactéries cultivables et des bactéries totales représentées par les pentes des courbes, sont également plus élevées lors du traitement continu à 0,1 ppm (dernière colonne des tableaux 46, 47, 48). Ces résultats démontrent qu'à 50 mg/j de ClO₂ l'injection continue (soit 0,1 ppm) est la plus appropriée pour obtenir la meilleure performance.

Paradoxalement, à faible dose de ClO₂, un résultat inverse a été retrouvé en comparant les performances de l'injection discontinue d'une quantité de 25 mg/j de ClO₂ et d'une injection en continu à 0,05 ppm (essai II). En effet l'injection discontinue de cette quantité de ClO₂ permet d'obtenir une meilleure performance que son l'injection continue.

Indépendamment de la modalité d'injection, ces résultats montrent également que la performance du ClO₂ pour une même durée d'incubation est proportionnelle à la concentration résiduelle et à la quantité totale injectée. Les traitements à 0,1 ppm en injection continue et à 50 mg/j en injection discontinue permettent d'obtenir les meilleures performances.

Considérant la durée d'application, sa prolongation permet d'améliorer la performance du ClO₂ quelle que soit la modalité d'injection.

Les traitements à forte dose (0,1 ppm et 50 mg/j) permettent donc d'obtenir une performance optimale très rapidement. A faible dose (0,05 ppm et 25 mg/j), l'aboutissement à une performance maximale est plus tardif. Des concentrations résiduelles de l'ATP et des bactéries cultivables se maintiennent dans les biofilms quelle que soit la concentration de ClO₂ appliquée, la modalité d'injection, la quantité totale injectée et la durée d'application. Pour les conditions d'application testées, ce biocide n'est donc pas germicide à 100% malgré les performances élevées observées aux plus fortes doses.

VI.2.4.2 En terme de reviviscence

L'arrêt des traitements au ClO₂ aboutit à une reviviscence dont l'amplitude est variable selon les traitements appliqués. Les résultats correspondants pour l'ATP et les bactéries cultivables sont présentés dans les tableaux 49 et 50, respectivement.

Tableau 49 : Estimation de la reviviscence en termes d'ATP, lors des traitements biocides au ClO₂

Traitements	Durée d'application du traitement (h)	Durée de la reviviscence (*)	Concentration minimale (%)	Concentration finale (%) (*)	Reviviscence (Conc min-Con fin en %) (*)	Pente de reviviscence (x100) (*)
Continu 0,1 ppm	144	144 (168*)	15	46 (74*)	31 (59*)	0,21 (0,35*)
Continu 0,05 ppm (I)	144	144 (168*)	52	64 (83*)	12 (31*)	0,083 (0,18*)
Continu 0,05 ppm (II)	312	144	36	40	4	0,018
Discontinu 10 mg/j	144	144 (168*)	-	88		
Discontinu 25 mg/j	312	144	27	44	17	0,07
Discontinu 50 mg/j	144	144 (168*)	23	58 (76*)	35 (53*)	0,24 (0,31*)

(**) Valeurs obtenues à 168 h après l'arrêt des traitements.

Tableau 50 : Estimation de la reviviscence du point de vue de la concentration des bactéries cultivables exprimée en Log lors des traitements biocides au ClO₂

Traitements	Durée d'application du traitement (h)	Durée de la reviviscence (*)	Concentration initiale	Concentration minimale	Concentration finale (*)	Reviviscence (Conc min-Con fin) (*)	Pente de reviviscence (x100) (Log/h) (*)
Continu 0,1 ppm	144	144 (168*)	4,21	1,95	3,77 (3,18*)	1,82 (1,33*)	1,26 (0,79*)
Continu 0,05 ppm (I)	144	144 (168*)	4,48	3,54	4,14 (4,16*)	0,6 (0,61*)	0,42 (0,36*)
Continu 0,05 ppm (II)	312	144	4,70	3,17	3,27	0,09	0,03
Discontinu 10 mg/j	144	144 (168*)		-	-		
Discontinu 25 mg/j	312	144	4,63	2,48	2,56	0,08	0,05
Discontinu 50 mg/j	144	144 (168*)	4,28	2,24	3,77 (3,93*)	1,53 (1,69*)	1,01 (1,06*)

(*) Valeurs obtenues à 168 h après l'arrêt des traitements.

L'amplitude de la reviviscence est la différence entre les valeurs enregistrées immédiatement après l'arrêt du traitement et les dernières valeurs enregistrées. De ce fait, les durées totales d'observation de la reviviscence ne sont pas identiques. Cette différence est la conséquence de la prolongation de la durée d'application des traitements à 312 h lors des deux derniers essais. Il est donc important de prendre en considération cette spécificité qui pourrait générer des différences d'interprétations des résultats. Ces calculs ont donc été réalisés sur les valeurs enregistrées 144 h après l'arrêt des traitements. Les valeurs obtenues à 168 h sont cependant présentées entre parenthèses.

Ces résultats montrent que la reviviscence après les traitements continus à 0,1 ppm et discontinu à 50 mg/j est la plus importante, quel que soit le paramètre pris en compte, traitements qui se sont avérés les plus efficaces. Ces résultats suggèrent donc qu'une performance élevée est associée ultérieurement à une reviviscence élevée. Pourtant l'amplitude de la reviviscence après le traitement discontinu à 25 mg/j va partiellement à l'encontre de cette remarque. La reviviscence observée après ce traitement, à 144 h d'incubation (17% d'ATP et 0,08 Log d' UFC) est beaucoup plus faible que celle observée après le traitement discontinu à 50 mg/j (35% d'ATP et 1,53 Log d'UFC). Ces deux traitements aboutissent pourtant à une performance similaire. L'association d'une performance élevée à une reviviscence élevée n'est donc strictement valable que pour les traitements continus. Le temps d'application semble jouer un rôle important dans le cas des traitements discontinus. La faible amplitude de la reviviscence observée lors des essais de traitement à 0,05 ppm et 25 mg/j pourrait trouver une explication dans le mode d'action de ces traitements et dans son effet sur le facteur trophique. Ces deux traitements ont eu un effet lent et progressif. La diminution de la consommation des nutriments serait également progressive et moins spectaculaire que celle observée lors des traitements à 0,1 ppm dont l'effet est plus rapide. Il

en résulterait donc une épargne nutritionnelle plus faible qui se traduit par une reviviscence de faible amplitude. Sous réserve d'une confirmation, on retrouve là aussi le rôle du facteur trophique, dans le phénomène de reviviscence après l'arrêt des traitements.

Au mêmes concentrations de ClO_2 (0,05 ppm) et modalité d'injection (continue), la prolongation de la durée d'application du traitement continu à 0,05 ppm de 144 h (essai I) à 312 h (essai II) a également permis de réduire l'amplitude de la reviviscence. Cette reviviscence est de 12 % d'ATP et de 0,6 Log d'UFC lors du premier essai associé à une durée d'application de 144 h et de 4% d'ATP et de 0,09 Log d'UFC lors de l'essai II associé à 312 h d'application. Ce résultat apporte la confirmation d'une réduction de l'amplitude de la reviviscence par la prolongation de la durée d'application, également observée pour les traitements discontinus. Ces résultats apportent l'information selon laquelle un traitement efficace mais de faible durée pourrait générer des reviviscences plus élevées, tandis que des traitements à faible dose, moins efficaces à court terme, pourraient s'avérer meilleurs sur le plan de l'efficacité et de la reviviscence s'il est appliquée pendant des durées prolongées. De plus ceci pourrait générer des économies en termes de quantité de biocide comme nous l'avons montré pour le traitement discontinu à 25 mg/j.

VI.3 Discussion

Lors de cette études, deux quantités de ClO_2 de 25 et 50 mg/j injectées en continu et en discontinu on été testées. L'injection continue ou discontinue de ces quantités a permis d'obtenir des concentrations de ClO_2 plus au moins stables (de 0,05 et 0,1 ppm respectivement). A forte dose, c'est-à-dire à 50 mg/j, c'est l'injection continue qui a permis d'obtenir de meilleures performances en termes d'efficacité vis-à-vis des indicateurs des biofilms analysés. A faible dose, c'est-à-dire à 25 mg/j, c'est plutôt l'injection discontinue qui a permis d'aboutir à de meilleures performances. Il faut néanmoins signaler que les injections discontinues ont été effectuées tous les 6 h. Ces modalités d'injection ne sont donc pas à l'image des injections discontinues d'autres biocides appliquées aux moins dans deux sites industriels étudiés lors de ce projet (chapitre VII). Dans ces sites, le traitement de référence appliqué est composé d'isothazolone et de DBNPA, injectés à 200 et 300 ppm, respectivement à raison d'une fois par semaine seulement.

Lors des traitements continu à 0,1 ppm et discontinu à 50 mg/j, un plateau (de stagnation de l'effet de traitement) a été atteint pour l'ATP et les bactéries cultivables. La diminution des concentrations des bactéries totales a été plus tardive et il n'a pas été possible d'aboutir à ce plateau. Ce phénomène a été observé dans d'autres études. Trinetta *et al.* (2012) montrent que l'exposition des cellules planctoniques de *Listeria monocytogenes* au ClO_2 sous forme de gaz aboutit à une inactivation progressive des cellules planctoniques, tandis que l'exposition des biofilms aboutit également à une inactivation mais un plateau est atteint dès 4 à 6 min d'exposition. Ce plateau a été atteint pour les bactéries cultivables et pour l'ATP lors des essais à 0,1 ppm et 50 mg/j et uniquement pour les bactéries cultivables lors des traitements à 25 mg/j et à 0,05 ppm prolongés à 312 h de durée d'application. L'application du traitement continu à 0,05 ppm pendant 144 h (essai I) n'a pas permis d'aboutir à ce plateau et l'inactivation a été progressive jusqu'à l'arrêt du traitement. Lors de notre étude précédente qui portait sur le procédé $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, le même constat a été fait. En effet, lors de ces essais, une inactivation progressive (plus ou moins rapide selon les traitements) a été observée lors des premières heures d'application puis un plateau a été atteint notamment, pour les bactéries cultivables. Le plateau observé pour l'ATP correspondait plutôt à la limite de détection puisque les valeurs étaient proches de zéro.

L'étude de l'efficacité des doses appliquées lors de ces essais, quelle que soit la modalité d'injection, montre l'existence de ce plateau. Plusieurs auteurs ont expliqué ce phénomène par la présence d'une sous population de microorganismes insensibles à ces doses de ClO₂. La présence de cette sous population de « persisters » a été montrée vis-à-vis des antibiotiques. L'exposition des biofilms d'*E. coli*, à des concentrations croissantes de la ciprofloxacine, aboutit à une baisse initiale des concentrations de cette bactérie dans les biofilms puis à un plateau. Une sous population d'*E. coli*, de faible concentration, résiste à ce traitement et se montre particulièrement insensible à une augmentation des doses d'antibiotique (Ashby *et al.*, 1994). Ce modèle d'inactivation a également été observé pour des biofilms de *Lactobacillus acidophilus* traités par l'amoxicilline et la clindamycine, pour des biofilms de *Gardnerella vaginalis* traités par l'érythromycine et le métronidazole (Muli *et al.*, 1998) et pour des biofilms de *P. aeruginosa* traités par l'ofloxacine (Brooun *et al.* 2000). Ces résultats ont été acquis sur des biofilms reconstitués à espèce unique et traités par des antibiotiques, alors que nos études ont porté sur des biofilms naturels, de composition inconnue et traités par des biocides. Néanmoins, nous avons observé ce phénomène dans plusieurs de nos essais de traitements de biofilms par deux biocides différents, le ClO₂ et l'H₂O₂/UV. La présence de cette population de microorganismes « résistants », expliquerait donc les plateaux observés et confirme le fait que les traitements que nous avons testés ne sont pas germicides à 100% vis-à-vis des biofilms.

Il semble donc que le biofilm emploie une double stratégie pour la survie à l'action des molécules antimicrobiennes. La première relève de l'expression des mécanismes de résistance dépendant de l'énergie tels que les pompes à efflux. La deuxième relève de la résistance passive qui résulte des processus d'adaptation au stress environnementaux et qui ne sont pas spécifiques à un groupe bactérien. D'ailleurs ce phénomène d'adaptation a été observé lors des essais de traitement à l'H₂O₂. D'autres auteurs décrivent d'autres stratégies de survie des bactéries dans les biofilms : la production de micro-bactéries (<0,1 µm) (Velimirov, 1994) ; la réduction du taux de croissance et l'arrêt du cycle cellulaire (Hayes *et al.*, 2003) ; la présence de cellules dites « persister » (Keren *et al.*, 2004 ; Lewis *et al.*, 2008 ; Balaban *et al.*, 2004). Cette sous-population bactérienne est particulièrement résistante aux antibiotiques, aux biocides et à certaines toxines (Allison *et al.*, 2011).

L'arrêt des traitements au ClO₂ lors de notre étude a été suivi d'une reviviscence due aux populations bactériennes résistantes au traitement qui reprennent leur croissance dès l'arrêt des traitements. Cette reviviscence a été plus importante après les traitements qui ont montré une performance élevée, résultat également observé lors des essais de traitement à l'H₂O₂.

Sous l'effet des traitements biocides, les bactéries peuvent adopter un mode de vie à un état VBNC, qui est un état de dormance réversible. Plusieurs études ont montré que l'exposition à des doses sublétales de biocides, notamment des biocides à base de chlore, induit l'entrée dans l'état VBNC. Wang *et al.* (2010) montrent que l'exposition d'*E. coli* et de *Legionella beliardensis* à un traitement chimique à base de chlore induit l'entrée de ces bactéries à l'état VBNC. Ils proposent un modèle d'inactivation des légionelles par le chlore en cascade : perte de cultivabilité, puis perte de l'intégrité membranaire et finalement de l'activité estérase. L'entrée à l'état de VBNC, sous l'effet des biocides chlorés a également été montrée pour d'autres bactéries (Howard et Inglis 2003 ; Keer et Birch, 2003). D'autre part, les cellules d'*E. coli* à l'état VBNC obtenues sous l'effet d'un traitement au chlore sont en mesure de redevenir cultivables par une culture dans un tampon phosphate (Dukan *et al.*, 1997). Les cellules de *Legionella* à l'état VBNC obtenues par un traitement modéré à

la monochloramine (<1 mg/L) sont également capables de se développer à nouveau par une co-culture avec des amibes (Alleron *et al.*, 2008).

Cette étude n'a pas permis de définir avec certitude les performances des différentes modalités de traitement au ClO₂ vis-à-vis de *L. pneumophila* et ses hôtes naturels. La détection de *Legionella* dans les biofilms (traités ou non) par la méthode de dénombrement culture dépendante n'a pas été possible. Les résultats du dénombrement par immunofluorescence, n'ont pas montré de différences significatives entre les concentrations de cette bactérie dans les différents biofilms (traités et non traités) du fait des incertitudes élevées.

Lors de ces essais, les amibes ont été dénombrées par observation microscopique directe après fixation. Les résultats montrent que seuls les traitements continus à 0,1 ppm et discontinus à 50 et 25 mg/j ont permis de réduire significativement leur concentration. Cela pourrait être dû à l'action biocide directe sur les cellules amibiennes, mais également à une action indirecte par privation nutritionnelle suite à la réduction de la concentration des bactéries. La réduction de la concentration des amibes pourrait aussi être due à ces deux types d'actions conjuguées. A ce stade de l'étude, il est impossible de privilégier l'une ou l'autre de ces hypothèses. L'étude de l'effet du ClO₂ sur des cellules amibiennes en suspension en présence et en absence de bactéries aurait permis de comprendre la nature de l'action du ClO₂ vis-à-vis des amibes mais n'aurait pu être faite que dans un contexte de biofilm amibien contrôlé.

Sur un plan opérationnel, notre étude aboutit à des conclusions, certes obtenues à l'échelle du laboratoire, mais qui pour certaines, pourraient tout de même être extrapolables à l'échelle des installations industrielles :

- à forte dose de ClO₂ (50 mg/j), l'injection continue aboutit à de meilleures performances ;
- à faible dose de ClO₂ (25 mg/j), l'injection discontinue peut permettre d'obtenir de bonnes performances, notamment en termes de bactéries cultivables mais la prolongation de la durée d'application est primordiale afin de minimiser l'amplitude de la reviviscence. il est donc possible de privilégier ces doses afin de limiter la formations des sous produits de désinfection et les coûts économiques liés à l'injection de fortes doses. La concentration de ClO₂ dépend tout de même de l'état de contamination des installations et de l'eau de refroidissement. Il faut donc adapter les concentrations du ClO₂ aux niveaux de contamination des installations traitées ;
- La reviviscence apparait peu de temps après l'interruption des traitements même si ces derniers ont été très performants. Il est donc important de veiller au maintien d'un résiduel de ClO₂ suffisant pour prévenir une nouvelle croissance bactérienne. D'autant plus que certains auteurs montrent que l'oxydation de la matière organique par le ClO₂ appliqué à de fortes doses (1,2 mg ClO₂/ mg COD, 24 h) n'est pas complète et aboutit à la formation de molécules organique biodégradables (Swietlik *et al.*, 2004). Ce résiduel pourrait être obtenu par injection continue ou par des injections discontinues assez rapprochées les unes des autres.

Nous n'avons pas réalisé d'études de l'effet de ces traitements vis-à-vis des microorganismes planctoniques. Néanmoins il a été montré dans la bibliographie, mais aussi lors de nos autres études (PEROX notamment), que les biofilms sont plus résistants que les microorganismes planctoniques à l'action des biocides. Des concentrations de ClO₂ efficaces vis-à-vis des biofilms le seraient donc très probablement vis-à-vis des microorganismes en suspension.

Par ailleurs, dans les installations industrielles de type TAR, un autre facteur s'ajoute à ces problèmes de quantité et de modalité d'injection, c'est la purge des eaux de refroidissement et les appoints qui lui correspondent. Ces deux processus pourraient avoir un effet négatif (effet de dilution et diminution des concentrations résiduelles du biocide) s'ils se produisent immédiatement après les injections discontinues. Une réflexion sur les modalités et la fréquence des purges doit donc être aussi envisagée lors de la mise en place des procédés de traitement.

VII- Etude de l'efficacité des procédés PEROX et SECUROX sur les biofilms développés dans des installations en vraie grandeur.

VII. Chapitre VII : Etude de l'efficacité des procédés PEROX et SECUROX sur les biofilms développés dans des installations en vraie grandeur

VII.1 Contexte de l'étude

Les conditions qui régissent le fonctionnement des TARs offrent un terrain favorable au développement microbien, notamment en l'absence de traitement biocide efficace. Ces conditions, comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie bibliographique, sont principalement :

- la présence d'eau nécessaire au fonctionnement des tours à voie humide ;
- un gradient de température étendu, résultant de transferts thermiques lors du refroidissement ;
- un effet de concentration des matières organiques par l'évaporation due au transfert thermique entre l'eau et l'air. Ces matières organiques sont une source de nutriment pour les microorganismes ;
- la disponibilité de grandes surfaces immergées dans l'eau, ouvertes au développement des biofilms ;
- un lessivage des particules en suspension dans l'atmosphère.

Cette charge microbienne est d'une grande diversité et concerne les bactéries, les champignons, les virus et les protozoaires. Elle abrite des bactéries potentiellement pathogènes et représente donc un problème du point de vue de la santé publique. Aucun des procédés de traitement déjà commercialisés n'est pleinement satisfaisant et c'est pourquoi la recherche d'une amélioration de leur performance et celle de procédés nouveaux restent un objectif permanent des recherches menées dans ce domaine.

Nous avons donc étudié les performances de deux biocides oxydants le ClO_2 et le couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ qui, dans des conditions expérimentales que nous avons adoptées (*Chapitres V et 6*), se sont avérés relativement performants. Cette partie du mémoire présente l'étude que nous avons faite de ces traitements dans des conditions en grandeur réelle, afin de valider les résultats obtenus à l'échelle expérimentale.

Les tours des deux sites retenus sont soumises habituellement à des traitements chocs au DBNPA et l'isothiazolone, à raison d'une injection par semaine pour chacun des deux biocides (*cf. Matériels et méthodes (§ III.3.1)*).

Lors des deux premières campagnes (2009 et 2010), le procédé Securox a été appliqué à l'une des tours, la seconde conservant son traitement d'origine (tour de référence). Lors de la campagne de 2011, le SECUROX et le PEROX se sont substitués, chacun dans une tour, au traitement d'origine.

Le détail des analyses a été présenté dans le chapitre 3.

VII.2 Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés par campagne de prélèvement et par ordre chronologique de leur réalisation. Dans l'ensemble des résultats présentés ci-dessous, les points et les barres d'incertitude représentent la moyenne de trois mesures.

VII.2.1 Campagne d'essais de 2009

Deux essais de traitement de deux mois chacun ont été organisés sur le site de Minatec. Durant le premier essai, le ClO_2 se substitue au traitement d'origine dans une tour et a été injecté en continu pour maintenir une concentration résiduelle de 0,1 ppm dans le bassin froid. Lors du deuxième essai, l'injection du ClO_2 a été diminuée pour obtenir une concentration résiduelle de 0,05 ppm. La deuxième tour a conservé le traitement de référence, à savoir, le DBNPA et l'isothiazolone (DBNPA/ISO).

Les substrats artificiels ont été déposés au début de chaque campagne (jour 0) et les prélèvements ont été effectués par intervalles de 15 jours environ. Quatre prélèvements des substrats artificiels ont été réalisés à chaque essai. Ces prélèvements ont été effectués en triplicat. Les prélèvements des substrats en place ont été réalisés à la fin de chaque essai. De ce fait, deux prélèvements ont été réalisés sur le site de Minatec.

Dans une 1^{ère} partie, les résultats de chacun des modes d'échantillonnage, substrats en place/substrats artificiels sont présentés séparément. Ils sont comparés entre eux dans une seconde partie.

VII.2.1.1 Evolution des températures des bassins froids

Les températures, ainsi qu'un certain nombre de paramètres physicochimiques de l'eau des bassins des tours, ont été suivis par le TRASAR (3D TRASAR®, NALCO, France) installé par la société NALCO à des fins analytiques.

L'évolution de ces températures est présentée dans la figure 144.

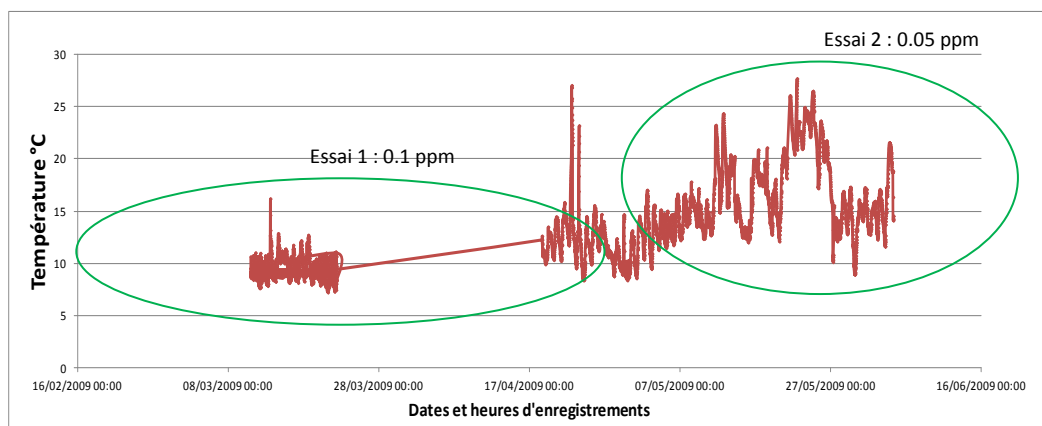


Figure 144 : Evolution des températures enregistrées par le dispositif TRASAR® lors de la campagne de prélèvement réalisée sur le site de MINATEC.

Cette figure montre une différence de température notable entre les deux essais avec un écart de l'ordre de 10°C. La température était significativement plus élevée lors de l'essai 2. Elle augmente progressivement pour atteindre un maximum de 25°C. La figure 145 simplifie ce suivi et

représente les moyennes des températures dans les deux tours enregistrées pendant les 15 jours qui ont précédé les prélèvements des substrats artificiels. Les températures enregistrées dans les deux tours n'étaient pas significativement différentes.

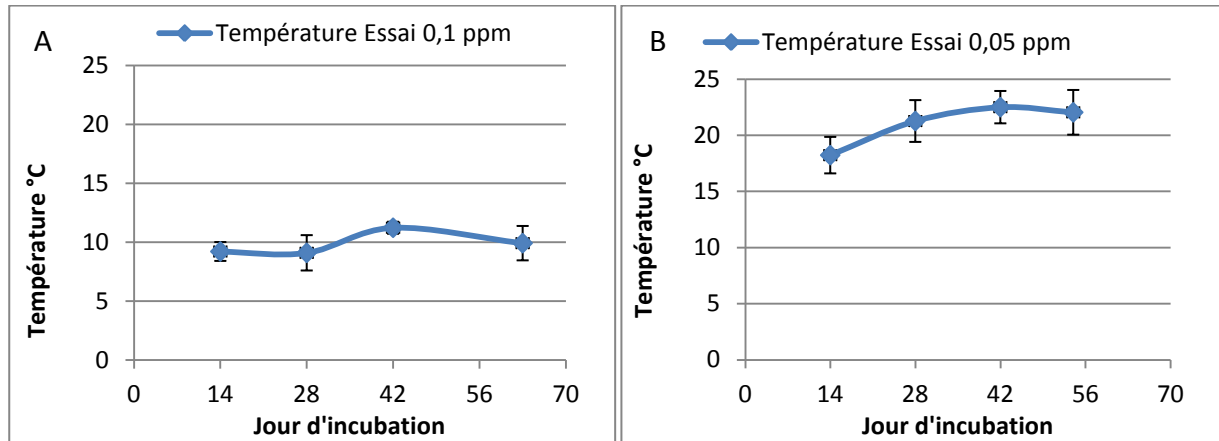


Figure 145 : Evolution des températures moyennes de l'eau des TARs au cours de chacune des deux phases (essais) (A : essai 0,1ppm ; B : essai 0,05 ppm) de la campagne de prélèvement réalisée sur le site de MINATEC. Les points représentent les moyennes des températures enregistrées durant les 15 j précédents la date du prélèvement.

VII.2.1.2 Biofilms des supports en place

Les résultats qui suivent reflètent l'état de contamination des tours après deux mois de traitements sachant qu'elles ont été nettoyées juste avant le démarrage de cette campagne et entre les deux essais. Les résultats présentés sont les moyennes et les écarts types calculés à partir des 3 réplicats.

Les prélèvements des biofilms à l'aide du dispositif d'échantillonnage ont été réalisés sur les parois des tours à raison de 3 échantillons par site de prélèvement : mur et sol. Ces prélèvements ont été réalisés à la fin des deux essais de traitement (0,1 et 0,05 ppm de ClO_2).

VII.2.1.2.1 Activité métabolique

Les concentrations d'ATP dans les biofilms prélevés sur les parois et le fond des TARs durant les deux essais sont présentées dans la figure 146.

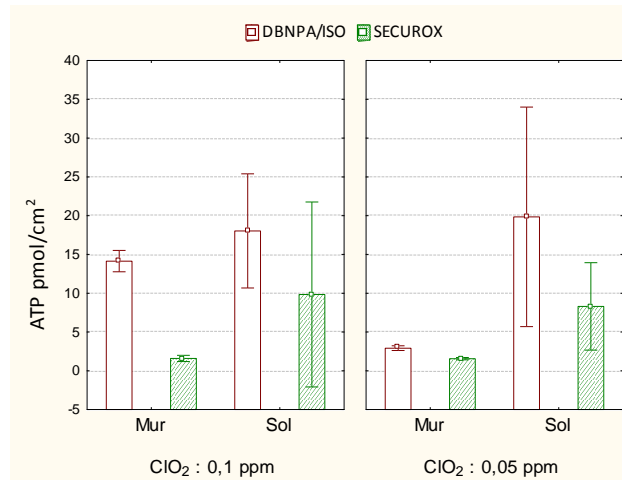


Figure 146 : Concentration d'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂)

Cette figure montre que pour les deux concentrations de ClO₂ testées, la différence des concentrations en ATP dans les biofilms des deux tours (référence / tour ClO₂) n'est significative que pour l'échantillonnage des parois et, en particulier, avec la concentration la plus forte de ClO₂.

Sur le plan des doses appliquées, la réduction de la concentration du ClO₂ de 0,1 ppm à 0,05 ppm ne provoque pas d'augmentation des concentrations de l'ATP. Les valeurs mesurées sur le fond des tours apparaissent plus variables (cf. barres d'incertitude) et plus élevées que celles des parois. Ceci est probablement lié à la récolte dans les échantillons de dépôts résultant d'une sédimentation notamment, de particules organiques, qui induiraient une plus grande activité métabolique. De ce fait, les résultats sont "bruités" et sont difficiles à prendre en compte pour juger de l'efficacité du procédé.

VII.2.1.2.2 Bactéries cultivables

Les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms prélevés sur les parois et sur le fond des TARs durant les deux essais sont présentées dans la figure 147. Ces résultats montrent que pour un traitement à 0,1 ppm de ClO₂, les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms de la tour traitée au ClO₂ sont plus basses, quel que soit le site d'échantillonnage : mur/sol. La diminution de la concentration de ClO₂ à 0,05 ppm induit une augmentation de la concentration des bactéries cultivables lors du deuxième essai dans les biofilms traités au ClO₂, augmentation significative dans le cas du fond des TARs.

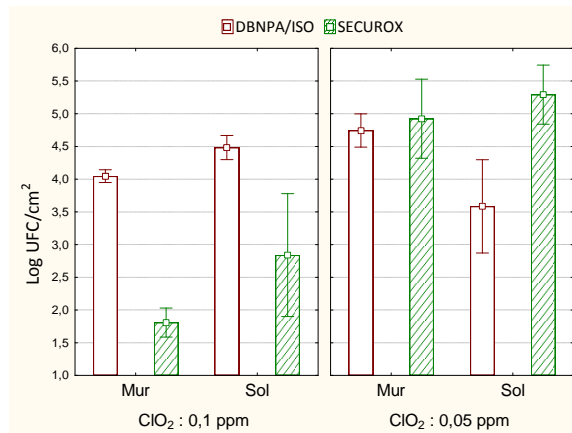


Figure 147 : Concentration de bactéries cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂)

Les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms de la tour de référence lors des deux essais, sont globalement stables dans les biofilms prélevés sur le sol et augmentent légèrement dans les biofilms prélevés sur les murs.

VII.2.1.2.3 Bactéries totales

Les concentrations de bactéries totales dans les biofilms des parois et du fond des TARs durant les deux essais sont présentées dans la figure 148.

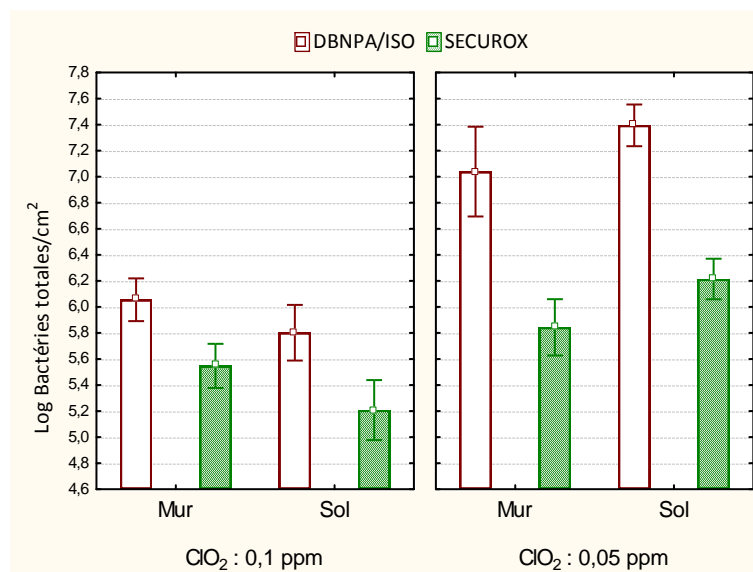


Figure 148 : Concentration de bactéries totales (Log₁₀ UFC/cm²) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂)

Dans tous les cas, les valeurs de la tour traitée par le Securox sont significativement plus basses que celles de la tour de référence. Les différences ne sont pas plus marquées dans le cas des parois que dans celui du fond des TARs.

Les écarts relatifs entre les concentrations de bactéries totales de la tour de référence et de la tour traitée par le Securox s'accroissent dans le cas du traitement à 0,05 ppm (16 % contre 9% à 0,1 ppm). Cela ne va pas dans le sens d'une réduction de la concentration du ClO₂ mais peut se justifier par une perte d'efficacité du traitement de référence suite à l'augmentation de la température. La différence de température de l'eau entre les deux phases de la campagne

témoigne d'une plus grande sollicitation des tours durant la 2^{ème} phase. Elle pourrait avoir joué un rôle dans le paradoxe relevé plus haut, par le biais de son action sur le métabolisme des bactéries et peut être aussi, sur la sélection des organismes qui composaient les populations microbiennes à chacune des deux périodes. Il est à noter, de ce point de vue, l'accroissement très net de la concentration des bactéries fixées de la tour de référence durant la 2^{ème} phase. Si l'on fait l'hypothèse d'une perte d'efficacité des deux traitements en liaison avec l'accroissement de la température de l'eau des tours, il semblerait que cette perte soit plus importante dans le cas du traitement initial des tours que dans le cas du Securox pour lequel la perte d'efficacité se justifie également par la réduction de la concentration du ClO₂.

VII.2.1.2.4 *Legionella pneumophila*

Aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'a été détectée par culture sur le milieu GVPC, même après concentration par la technique IMS. Les concentrations des *L. pneumophila* totales mesurées par immunofluorescence sont présentées dans la figure 149.

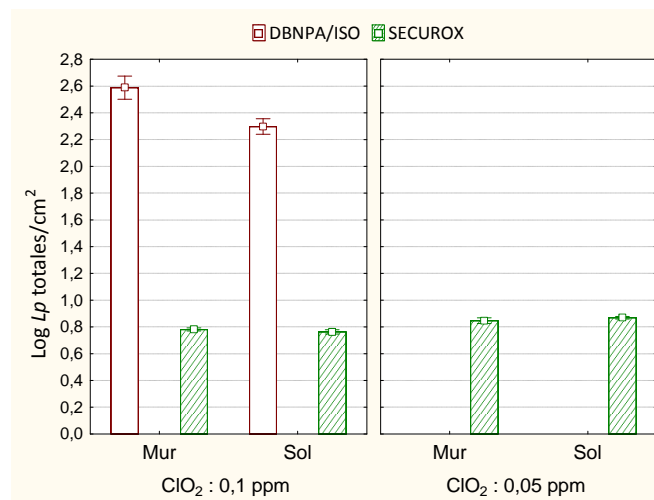


Figure 149 : Concentration de *L. pneumophila* totales (Log₁₀ Lp totales/cm²) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂)

Une forte concentration de *L. pneumophila* totales a été détectée dans les biofilms de la tour de référence lors de la 1^{ère} phase de la campagne. Aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'ayant été détectée dans cette tour, ce résultat témoigne une nouvelle fois, de l'absence de relation constante entre les effectifs totaux et les effectifs cultivables des bactéries.

Lors du deuxième essai les *L. pneumophila* deviennent indétectables dans la tour de référence. Cette absence pourrait être liée à un effet de masque par d'autres éléments en suspension, plus élevé dans le cas de l'essai 2, notamment suite à l'accroissement de l'épaisseur des biofilms, comme le témoigne le résultat des bactéries totales. Cet "effet 'masque'", a été moindre dans la tour traitée avec 0,05 ppm de ClO₂ et nous a permis de détecter dans ce cas *L. pneumophila*.

Sur le plan de l'efficacité du traitement Securox vis-à-vis de *L. pneumophila*, les écarts entre la tour de référence et la tour traitée observés durant la 1^{ère} phase, sont suffisamment démonstratifs (différence de 2 Logs)

Il est à noter également l'accroissement de faible amplitude, mais significatif, de *L. pneumophila* totales lorsque le traitement passe de 0,1 ppm à 0,05 ppm. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse que cette dernière valeur pourrait être celle de la limite d'efficacité du Securox, avec alors une reviviscence de *L. pneumophila*.

VII.2.1.2.4.1 Amibes

Les concentrations des amibes dans les biofilms des parois et des sols des tours sont présentées dans la figure 150.

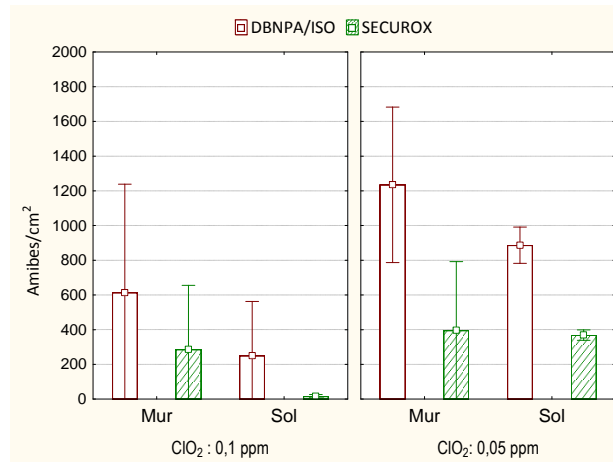


Figure 150 : Concentration des amibes (Amibes/cm²) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂)

Etonnement, les résultats du dénombrement des amibes dans les biofilms montrent que les différences entre la tour de référence et la "tour Securox" ne sont significatives que dans le cas du traitement le plus faible (0,05 ppm) pour le prélèvement des sols. Il faut noter cependant que les concentrations d'amibes présentes lors de l'essai 0,1 ppm ont été plus faibles, comme d'ailleurs dans la tour de référence. La température semble donc jouer un rôle important dans la concentration en amibes. La figure 151 présente l'évolution des concentrations moyennes des amibes (dans les deux tours et en faisant abstraction des sites de prélèvements) en fonction des températures moyennes des tours relevées à chaque essai (10°C lors de l'essai à 0,1 ppm et 21°C lors de l'essai à 0,05 ppm) :

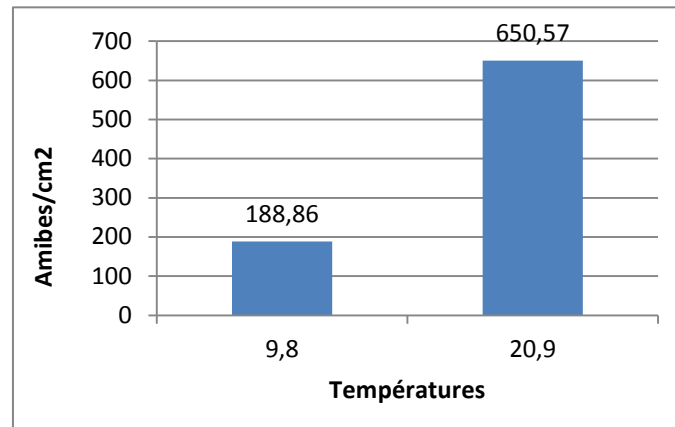


Figure 151 : Relation entre températures de l'eau des tours et concentrations des amibes

Elle apporte la démonstration d'une étroite relation entre la température d'incubation et la concentration des amibes. L'augmentation des concentrations de bactéries lors de la 2^{ème} phase suggère également que l'effet de la température sur la concentration des amibes passe indirectement, par l'effet de la température sur la concentration des bactéries. Ces dernières constituent en effet la principale source nutritionnelle des amibes.

La figure 150 montre par ailleurs que, du point de vue de la concentration en amibes, les échantillons prélevés sur les parois ne diffèrent pas significativement de ceux prélevés sur le fond des TARs.

En Conclusion

Les résultats obtenus avec ce mode d'échantillonnage montrent que la performance du ClO₂ à 0,1 ppm est globalement supérieure à celle du traitement de référence (DBNPA et Isothiazolone) vis-à-vis des bactéries totales et cultivables. A 0,05 ppm, la performance du ClO₂ n'apparaît supérieure que pour les bactéries totales.

La diminution de la concentration du ClO₂ de 0,1 à 0,05 ppm se traduit par une augmentation des concentrations de bactéries totales et cultivables. Il semble donc qu'à cette concentration, le traitement ait atteint une limite d'efficacité, avec le constat qu'il semble ne plus permettre la maîtrise complète du développement des biofilms lorsque la température augmente.

Concernant les légionelles, aucune forme cultivable n'a été détectée quel que soit le type et la concentration du traitement. Par contre, une concentration anormalement élevée de *L. pneumophila* totales a été observée dans la tour de référence lors de l'essai 1 (>2,5 Log), résultat qui doit être considéré avec précaution. La concentration des *L. pneumophila* totales sous traitement Securox sont très faibles (<1 Log) quel que soit le site de prélèvement et la concentration de ClO₂.

Les concentrations des amibes dans les biofilms sont généralement similaires dans les deux tours et ne semblent pas être affectées par la concentration du ClO₂, mais plutôt par la température de l'eau et la concentration des bactéries dans les biofilms.

VII.2.1.3 Biofilms récoltés sur substrats artificiels

VII.2.1.3.1 Activité métabolique

L'évolution des concentrations d'ATP au cours de chacune des deux phases de la campagne est présentée dans la figure 152. En outre, les concentrations d'ATP dans la tour traitée au ClO₂ sont présentées séparément, à une autre échelle, pour mieux visualiser les différences entre les deux essais (figure 152-B).

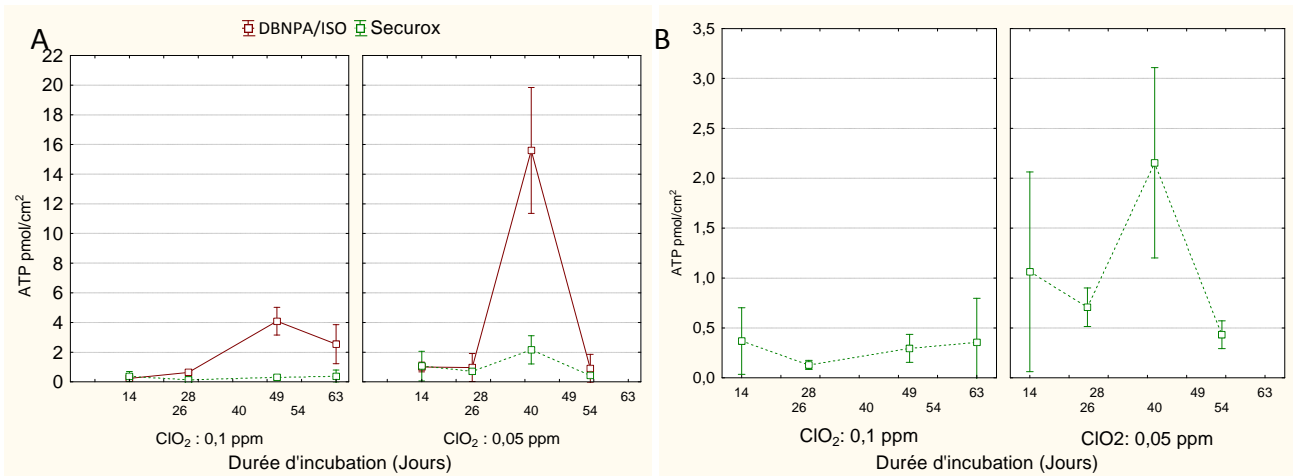


Figure 152 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms des substrats artificiels (A) (courbe rouge : tour de référence, courbe verte : tour traitée au ClO₂) (B) dans la seule tour traitée au ClO₂ à 0,1 ppm et 0,05 ppm.

La figure 152 A montre que pour les deux concentrations en ClO₂ testées, l'activité métabolique des biofilms était similaire dans les deux tours lors des deux premiers enregistrements et qu'elle devient plus forte dans la tour de référence que dans la tour Securox lors des deux derniers points. Ceci suggérerait une meilleure efficacité du traitement Securox par comparaison au traitement initial des tours.

La figure 152 B, à une autre échelle, montre que la concentration en ATP semble accrue sous l'effet de la diminution de la dose de ClO₂ appliquée.

Pour rappel, l'analyse des substrats en place n'a pas permis de mettre en évidence de telles différences en termes de concentration d'ATP.

VII.2.1.3.2 Bactéries cultivables

La concentration des bactéries cultivables ainsi que les vitesses de colonisation initiales des supports artificiels sont présentées dans la figure 153. Les vitesses de colonisation initiales sont calculées entre le jour du dépôt des lames et le jour des premiers prélèvements (J14).

La figure 153 A montre que la concentration des bactéries cultivables est plus basse dans les biofilms traités au ClO₂ quelle que soit la concentration appliquée. On observe cependant une augmentation ponctuelle de la concentration à J45 lors du deuxième essai, qui atteint un niveau comparable à celui des biofilms de la tour de référence. À J60 cette concentration devient à nouveau inférieure à celle des biofilms de référence. L'efficacité du procédé Securox est particulièrement nette quelle que soit la concentration, notamment si l'on considère les vitesses de colonisation (figure 153 B).

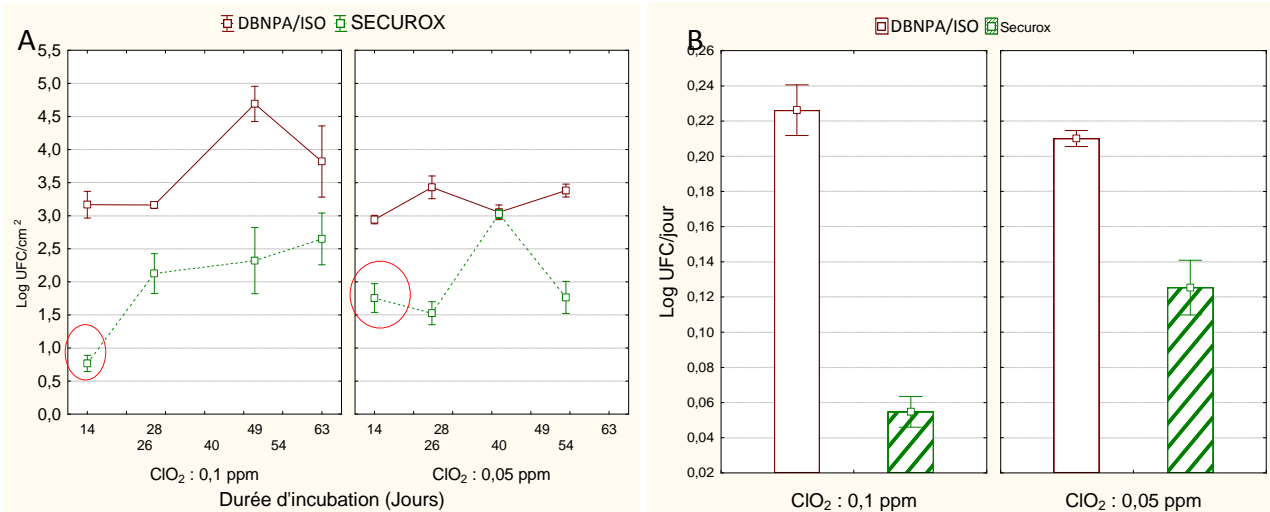


Figure 153 : (A) Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log₁₀UFC/cm²) dans les biofilms des substrats artificiels (Courbe rouge : tour de référence, courbe verte : tour traitée au ClO₂) (B) les vitesses de colonisation initiales (Log₁₀UFC/jour (remplissage uniforme : tour de référence, remplissage hachuré : tour Securox).

La diminution de la concentration de ClO₂ de 0,1 ppm à 0,05 ppm se traduit essentiellement par :

- une concentration plus élevée à 0,05 ppm mais uniquement à J14 au delà duquel les concentrations des bactéries cultivables lors des deux phases deviennent similaires ;
- une vitesse de colonisation plus élevée à 0,05 ppm.

Ces résultats rejoignent donc ceux obtenus à partir des biofilms des supports en place au sujet de la limite d'efficacité du procédé Securox.

VII.2.1.3.2.1 Bactéries totales

Les concentrations des bactéries totales ainsi que les vitesses initiales de colonisation sont présentées dans la figure 154 A et B.

L'évolution dans le temps des concentrations des bactéries totales (figure 154 A) montre que dès J14 les valeurs sont plus élevées dans les biofilms de la tour de référence que dans la tour Securox. Cela reste le cas par la suite pour la concentration de 0,1 ppm. On note que, dans le cas de l'essai à 0,05 ppm, les valeurs de la "tour Securox" rejoignent celle de la tour de référence dans la seconde moitié de l'incubation.

Les différences significatives observées à J14 s'expliquent par l'effet du traitement Securox sur la vitesse initiale de colonisation des supports. La figure 154 B montre qu'elle est nettement supérieure dans la tour de référence quelle que soit la concentration du ClO₂. Le passage du traitement de 0,1 à 0,05 ppm n'induit ni une augmentation de la concentration des bactéries totales, ni d'ailleurs, de la vitesse initiale de colonisation (contrairement à ce qui a été observé avec les bactéries cultivables).

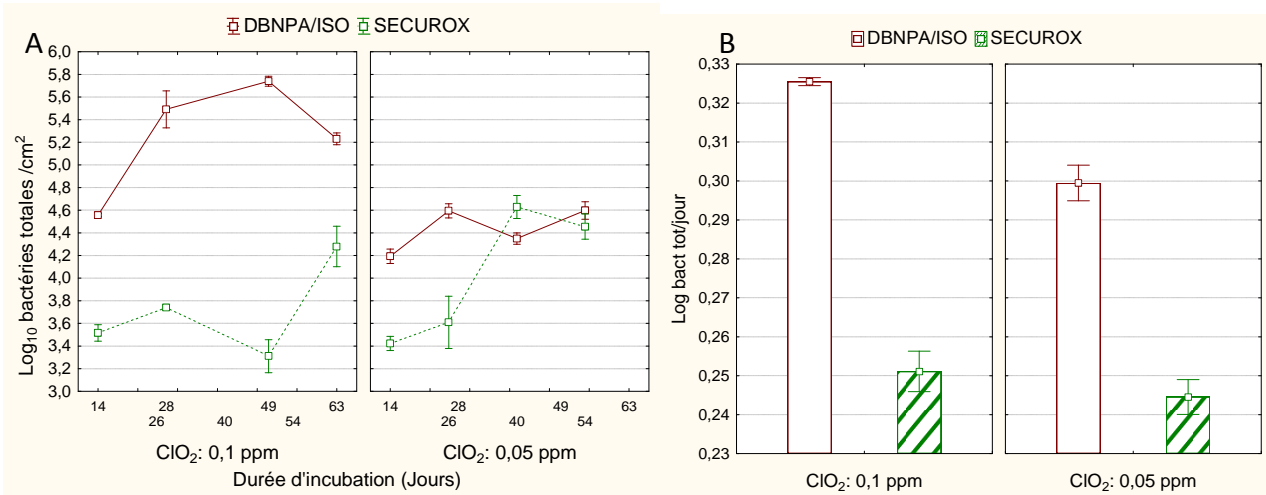


Figure 154 : (A) Evolution des concentrations des bactéries totales (Log₁₀bact tot/cm²) dans les biofilms des substrats artificiels (courbe rouge : tour de référence, courbe verte : tour traitée au ClO₂) (B) les vitesses de colonisation initiales (Log₁₀ bact tot /jour (remplissage uniforme : tour de référence, remplissage hachuré : tour Securox).

VII.2.1.3.3 Legionella pneumophila

Aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'a été détectée lors de l'essai à 0,1 ppm. L'évolution des concentrations des *L. pneumophila* totales mesurée par immunofluorescence est présentée dans la figure 155.

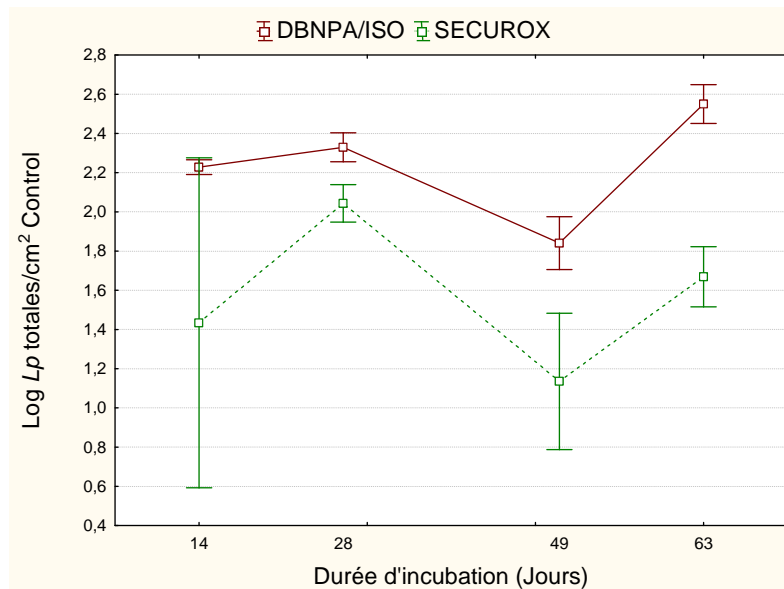


Figure 155 : Evolution des concentrations de "*L. pneumophila* totales" (Log₁₀ Lp/cm²) dans les biofilms développés sur substrats artificiels (courbe rouge : tour de référence, courbe rouge : tour traitée au ClO₂)

L'ordre de grandeur des concentrations des cellules marquées par immunofluorescence (*L. pneumophila* dites "totales") est voisin de celui observé sur les supports en place. Ces concentrations dans les biofilms traités au ClO₂ à 0,1 ppm restent systématiquement inférieures à celles de la tour de référence.

Lors de l'essai à 0,05 ppm de ClO_2 , l'absence de *L. pneumophila* totales pourrait s'expliquer, la aussi, par des problèmes techniques à savoir l'effet de masque des éléments en suspension ou les faibles concentrations de *L. pneumophila* dans les biofilms. En effet, dans ce cas, les concentrations de bactéries totales étaient beaucoup plus fortes.

VII.2.1.3.4 Amibes

Aucune amibe n'a été détectée dans les biofilms des substrats artificiels, ceci pourrait être attribué à la limite de détection de la technique de dénombrement et aux faibles concentrations de ces organismes dans les biofilms.

En Conclusion

Ces résultats montrent que la performance du ClO_2 dépend de sa concentration. La diminution des concentrations de ClO_2 de 0,1 à 0,05 conduit à une augmentation des concentrations des indicateurs analysés. Les résultats confirment également le fait que le traitement à 0,05 ppm de ClO_2 est proche d'une limite à partir de laquelle l'efficacité du procédé diminue et parfois ne se démarque plus de celle du procédé de référence (DBNPA/Isouthiazolone).

*Sur le plan de *L. pneumophila*, aucune forme cultivable n'a été détectée durant les deux phases d'expérimentation. Le dénombrement des *L. pneumophila* totales, dans le cas du traitement à 0,1 ppm de ClO_2 , suggère que le traitement Securox s'avère également être plus performant pour limiter le risque légionelles, que le traitement de référence.*

VII.2.1.4 Comparaison des résultats obtenus par les deux techniques d'échantillonnage

L'analyse des biofilms développés sur substrats artificiels pourrait simplifier la démarche d'échantillonnage des biofilms et de ce fait, pourrait constituer l'un des éléments d'une technique opérationnelle généralisable de prise en considération des biofilms dans le suivi des TARs. Cette démarche pourrait néanmoins représenter un biais du fait notamment de l'âge des biofilms et de la nature des matériaux des supports artificiels utilisés.

Les résultats acquis au cours de la campagne 2009 sont résumés dans le tableau 51 et permettent d'apporter quelques informations au sujet du 1^{er} point.

Tableau 51 : Comparaisons des résultats obtenus par l'analyse des substrats artificiels et les substrats en place lors de la campagne de 2009

Nature substrat	Essais	Sites	Durée d'incubation (J)	ATP (pmol/ Cm ²) DBNPA/ISO (*)	ATP (pmol/ Cm ²) Securox (*)	UFC (Log ₁₀ /cm ²) DBNPA/ISO (*)	UFC (Log ₁₀ /cm ²) Securox (*)	Bactéries totales (Log ₁₀ /cm ²) DBNPA/ISO (*)	Bactéries totales (Log ₁₀ /cm ²) Securox (*)
naturels	I	Mur	63	14,14 (1,38)	1,59 (0,41)	4,05 (0,1)	1,81 (0,22)	6,06 (0,16)	5,55 (0,17)
	I	Sol	63	14,22 (5,36)	6,83 (8,7)	4,23 (0,2)	2,84 (0,9)	5,80 (0,21)	5,21 (0,23)
artificiels	I	/	63	2,19 (0,47)	0,86 (0,49)	3,82 (0,54)	2,65 (0,39)	5,23 (0,1)	4,28 (0,2)
naturels	II	Mur	54**	2,92 (0,3)	1,33 (0,42)	4,74 (0,25)	4,92 (0,61)	7,04 (0,34)	5,84 (0,22)
	II	Sol	54**	14,25 (9,81)	6,51 (1,03)	3,58 (0,7)	5,29 (0,45)	7,39 (0,39)	6,21 (0,16)
artificiels	II	/	54	0,62 (0,82)	0,04 (0,01)	3,38 (0,10)	1,76 (0,24)	4,60 (0,1)	4,46 (0,11)

(*)Ecart types

**Les tours ont subi un nettoyage physique entre les deux essais.

Ces résultats montrent que, quels que soit les indicateurs biologiques, les analyses des biofilms développés sur des supports naturels et artificiels conduisent aux mêmes conclusions en terme de performance du ClO₂. Les deux démarches analytiques permettent également de mettre en évidence la baisse de la performance du ClO₂ suite à la diminution des concentrations résiduelles de 0,1 à 0,05 ppm.

Ces résultats montrent cependant que les concentrations des indicateurs sont plus faibles dans les biofilms développés sur des supports artificiels bien que la durée d'incubation ait été identique pour les deux types de support. On note également que les valeurs de l'ATP des sols (substrats en place) sont associées à de fortes incertitudes. En effet les deux tours étudiées lors de cette campagne ont été nettoyées avant chacun des deux essais, les biofilms qui se développent sur les substrats artificiels et naturels ont donc la même durée d'incubation. Cette différence pourrait s'expliquer par :

- la nature des supports employés qui générerait des vitesses de colonisation plus ou moins élevées. Dans notre cas le support "acier" (tour) se prêterait à des vitesses de colonisation plus élevées que le support "verre" (artificiel) ;
- les forces hydrodynamiques auxquelles sont soumises les lames qui sont déposées dans les bâches des tours, elles sont à l'évidence soumises à des forces de turbulence plus importantes et différentes que celles auxquelles les parois naturelles des tours sont soumises.

VII.2.1.5 Comparaison des résultats obtenus par l'analyse de l'eau et l'analyse des biofilms

Durant cette campagne, l'analyse de l'eau a été réalisée selon les exigences réglementaires à raison d'une analyse par mois. Nous ne disposons que des résultats de l'analyse de la tour traitée au ClO₂ et cette analyse ne concerne pas tous les indicateurs de l'analyse des biofilms. Compte tenu de la nature des milieux analysés (eau, d'une part, supports, d'autre part), et donc des unités différentes dans lesquels les résultats sont exprimés, l'objectif, ici, est de comparer les résultats sur le plan de la détection des bactéries et du sens de l'évolution des effectifs, quand cela a été possible.

La comparaison présentée dans le tableau 52 ne porte que sur les résultats de la tour traitée au ClO₂ et ceux des biofilms développés sur les substrats artificiels.

Tableau 52 : Comparaison des résultats de l'analyse de l'eau et de l'analyse des biofilms des substrats artificiels du point de vue des bactéries cultivables et des "*L. pneumophila* totales" de la tour traitée au ClO₂

essai	durée d'incubation (J)	Bactéries cultivables			<i>L. pneumophila</i> totales	
		Eau		Biofilm	Eau	Biofilm
		UFC /ml	Log ₁₀ UFC/ml	Log ₁₀ UFC/cm ²	<i>Lp</i> UG/L (PCRQ)	Log ₁₀ <i>Lp</i> /cm ² (immunofluorescence)
I	49	<1	/	2,3	<500	1,1
II	15	46	1,66	1,8	<500	indétectable
II	42	630	2,7	3,0	<500	1,2

Cette comparaison montre que l'analyse de l'eau et des biofilms n'aboutissent pas aux mêmes informations dans tous les cas. En effet l'analyse des bactéries cultivables lors de l'essai 1 ne fait apparaître aucune correspondance. Leur concentration est de 2,3 Log/cm² dans les biofilms alors

qu'elles sont indétectables dans l'eau. Les résultats de l'essai 2, par contre, font apparaître une correspondance entre l'analyse de l'eau et des biofilms. Ces concentrations augmentent en effet entre J15 et J42 dans les biofilms mais aussi dans l'eau.

Concernant la comparaison en termes de performances de ClO_2 vis-à-vis des biofilms et des microorganismes en suspension, nous ne disposons pas des résultats de l'analyse de l'eau de la tour traitée par le DBNPA/Isouthiazolone.

VII.2.2 Campagne d'essais de 2010

Rappel : Le site d'étude pour cette campagne est celui des deux tours aéro-réfrigérantes du bâtiment du Conseil Général de l'Isère à Grenoble (CG38). Le ClO_2 a été initialement prévu pour remplacer le traitement en place dans la tour « essai ». Suite à des problèmes de communication le traitement à l'isouthiazolone a été maintenu en association avec le traitement au ClO_2 du procédé Securox. Dans la tour de référence, le traitement en place a été maintenu durant toute la période de cette campagne aux mêmes taux de traitement. Les résultats obtenus ne reflètent donc pas la vraie performance du ClO_2 . Ces résultats nous serviront principalement pour comparer les résultats des deux modalités d'échantillonnage.

Les traitements de la campagne 2010 sont désignés DBNPA/ISO et ClO_2 /ISO (ISO pour Isouthiazolone) dans les paragraphes suivants.

Trois essais ont été réalisés lors de cette campagne. Il est à noter que les tours n'ont pas été arrêtées, ni nettoyées entre les essais. Les biofilms des supports en place étaient donc présents au démarrage de l'essai suivant.

Les analyses du dernier essai ont été arrêtées à J42 avec l'arrêt des tours en raison de la baisse prématurée de la température atmosphérique.

VII.2.2.1 Principales caractéristiques physicochimiques des traitements appliqués

Les caractéristiques des traitements ont été données précédemment (tableau 6) dans la partie Matériels et Méthodes mais en réalité les concentrations résiduelles et l'apport journalier de ClO_2 ont été obtenus à la fin de chaque expérience.

L'apport journalier de ClO_2 qui a été prévu au démarrage de cette expérience était de 1 g/ jour. Cet apport s'est avéré insuffisant pour maintenir une concentration résiduelle de 0,1 ppm. Il a donc été augmenté à 5 g/jour. Lors de la dernière expérience il a dû être de nouveau augmenté pour atteindre 6,5 g/jour. Il peut donc être admis que du point de vue de la concentration résiduelle en ClO_2 les 3 expériences sont équivalentes.

VII.2.2.2 Evolution des températures des bassins froids

L'évolution des températures dans l'eau des bûches des tours est présentée dans la figure 156.

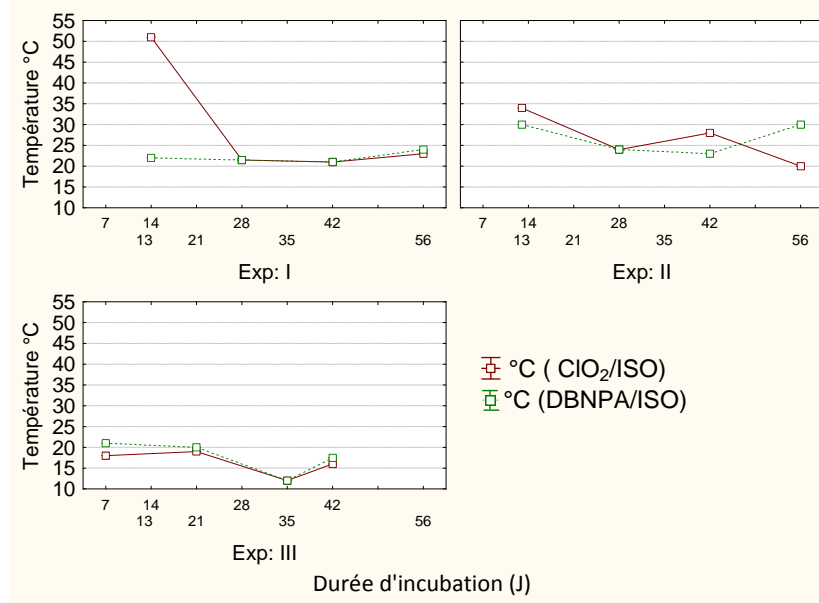


Figure 156 : Evolution des températures des bassins froids des tours lors de la campagne 2010.

Mis à part la différence de température constatée au début de l'expérience I entre la température de la tour traitée au ClO₂/Isothiazolone (51°C) et la température de la tour traitée par le couple DBNPA/ Isothiazolone (23°C), les températures des deux tours sont restées très comparables durant le reste de la campagne (figure 156). La température moyenne durant chacune des 3 phases de la campagne a, par contre, sensiblement changé avec des moyennes de 22°C, 26°C et 15°C, respectivement pour les phases I, II et III de la campagne.

VII.2.2.3 Biofilms des substrats en place

Seuls deux prélèvements de substrats en place ont été effectués lors de cette campagne au terme des phases II et III (expérience II et expérience III).

VII.2.2.3.1 Activité métabolique

Les concentrations de l'ATP dans les biofilms prélevés sur les substrats en place sont présentées dans la figure 157.

Globalement, les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les traitements du point de vue de la concentration en ATP des biofilms (figure 157). Il est à noter cependant, les fortes incertitudes associées au jeu de données de la 1^{ère} expérience.

Les analyses réalisées durant l'expérience III se situent dans la continuité de celles de l'expérience II puisque le niveau des traitements n'a pas été changé et que les tours n'ont pas été nettoyées. La baisse significative des concentrations en ATP lors de l'expérience III, peut donc être, le résultat de l'action à long terme des traitements. L'évolution de la température moyenne des bassins froids peut aussi avoir joué un rôle en passant de 26°C pour l'expérience II à 15°C pour l'expérience III.

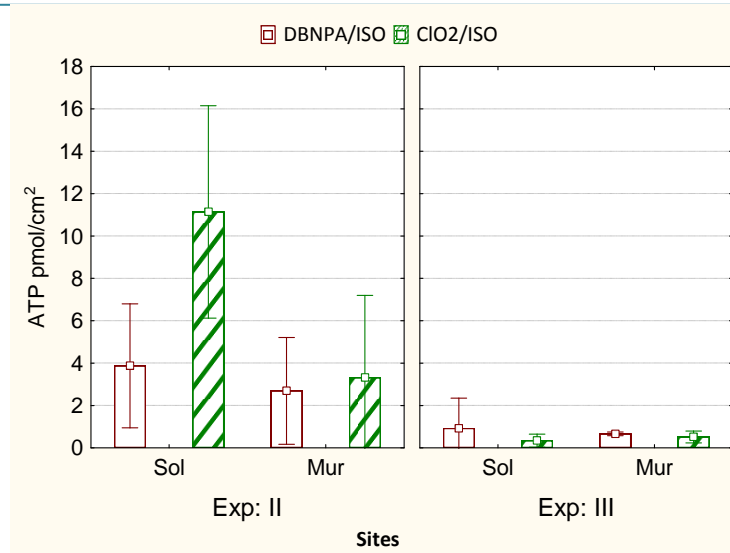


Figure 157 : Concentrations d'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms des murs et des sols des tours traitées par DBNPA/ISO (remplissage uniforme) et par ClO₂/ISO (remplissage hachurée).

VII.2.2.3.2 Bactéries cultivables

Les concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms prélevés sur les parois des tours sont présentées dans la figure 158.

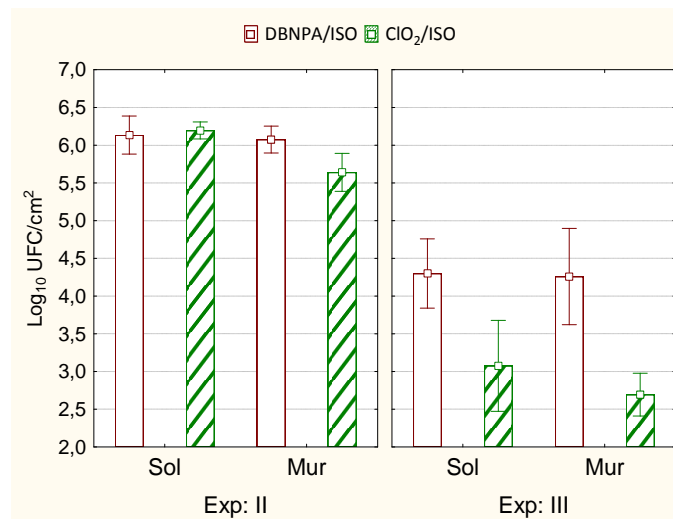


Figure 158 : Concentrations des bactéries cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) dans les biofilms des sols et des murs des tours traitées au DBNPA/ISO (remplissage uniforme) et le ClO₂/ISO (remplissage hachuré).

Ces résultats montrent que lors de l'expérience II, les concentrations de bactéries cultivables des biofilms traités au DBNPA/ISO et au ClO₂/ISO ne sont pas significativement différentes. Lors de l'expérience III, ces concentrations sont plus faibles dans la tour traitée au ClO₂/ISO quel que soit le site d'échantillonnage (parois, fonds). On retrouve pour cet indicateur la remarque faite plus haut concernant l'ATP, les concentrations des bactéries cultivables tous sites d'échantillonnage confondus, sont également plus faibles lors de cette expérience quelque soit le traitement appliqué (figure 158).

VII.2.2.3.3 Bactéries totales

Cet indicateur apporte deux informations essentielles qui confirment les résultats des deux indicateurs précédents (figure 159). Le couple ClO₂/ISO est plus performant que le couple DBNPA/ISO. Ce constat est plus net pour les échantillons des parois que pour ceux du fond du fait des incertitudes plus élevées pour ces derniers.

On retrouve, la aussi, une baisse des concentrations des bactéries totales lors de l'expérience III pour tous les échantillons et quel que soit le traitement appliqué. Ce résultat peut être attribué à un effet progressif et lent des traitements, à l'origine d'une poursuite de la réduction de la concentration bactérienne (on ne voit pas apparaître de stabilisation des valeurs) mais aussi à un rôle conjoint de la baisse de la température.

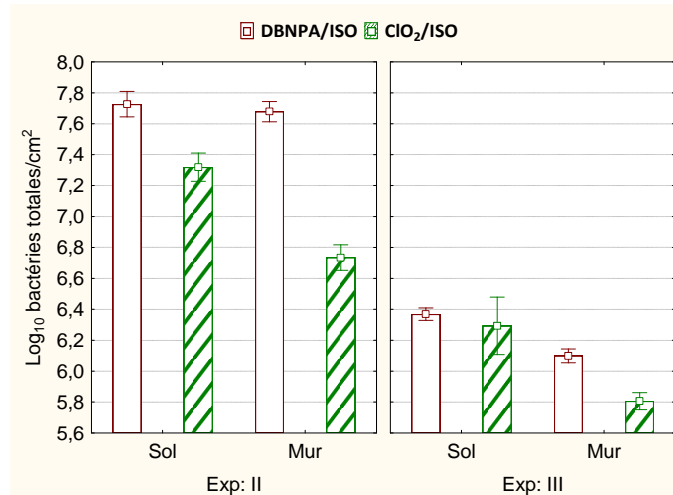


Figure 159 : Concentrations des bactéries totales (Log₁₀ N/cm²) dans les biofilms des parois et du fond des tours. Remplissage uniforme : DBNPA/ISO, remplissage hachuré : ClO₂/ISO

VII.2.2.3.4 Legionella pneumophila

Aucune *L. pneumophila* n'a été détectée dans les biofilms prélevés des substrats en place des tours quelque soit la technique de dénombrement (culture et immunofluorescence) et quelque soit le traitement appliqué.

VII.2.2.3.5 Amibes

Les concentrations des amibes dans les biofilms prélevés sur les substrats en place sont présentées dans la figure 160. Ces résultats montrent que les traitements n'ont pas d'effets significativement différents sur la concentration des amibes, à l'exception des biofilms des parois, lors de l'expérience I.

Comme dans le cas des indicateurs précédents, ces résultats montrent une décroissance de la concentration des amibes sur les 6 mois de la campagne au point qu'elles deviennent indétectables dans les parois lors de l'expérience III. Cette décroissance pourrait être liée à l'effet progressif et lent des deux traitements et à l'effet conjoint de la température, mais aussi à la baisse des concentrations de bactéries, principale source de nutriments des amibes.

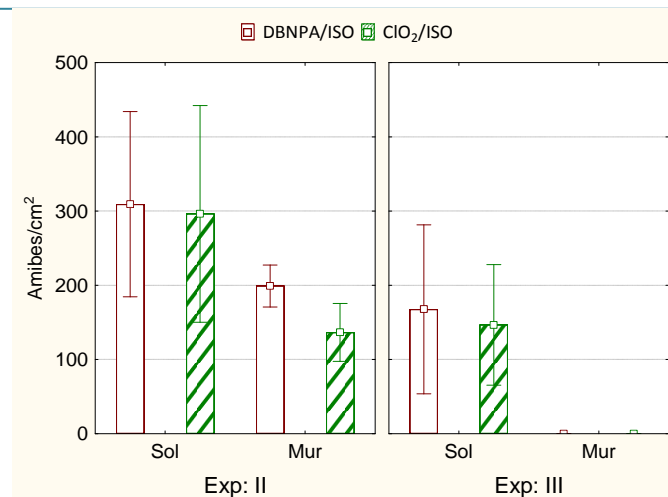


Figure 160 : Concentrations des amibes (amibes/cm²) dans les biofilms des parois et du fond des tours. Remplissage uniforme : DBNPA/ISO, remplissage hachuré : ClO₂/ISO

En Conclusion

L'analyse des biofilms, prélevés sur les supports en place, montre que les deux traitements appliqués aboutissent aux mêmes performances. Des différences significatives apparaissent cependant avec la concentration des "bactéries totales" et ponctuellement, avec les autres indicateurs, essentiellement dans le cas des échantillons des parois des tours. Ces résultats montrent également que ces échantillons sont plus homogènes que ceux du fond des tours. Quand une différence existe, elle montre, là encore, que le couple ClO₂/ISO est plus performant que le couple DBNPA/ISO.

De plus, ces résultats indiquent que les traitements n'aboutissent pas à une éradication complète au terme des 6 mois de la campagne et ce, malgré une baisse de la température d'environ 5°C entre les deux expériences. La persistance des amibes dans les biofilms durant cette campagne, n'est pas conjointe à la détection de *L. pneumophila* dans les biofilms selon des techniques d'analyse employées, toutefois.

VII.2.2.4 Biofilms récoltés sur substrats artificiels

Durant la campagne de 2010, 3 expériences (expériences I, II et III) de traitement ont été réalisées, durant lesquelles les biofilms développés sur les substrats artificiels ont été analysés. La dernière expérience, a dû s'interrompre avant terme pour des raisons climatiques qui ont poussé le gestionnaire des tours à arrêter leur fonctionnement. Le dernier prélèvement correspondant à la durée d'incubation de 56 jours n'a donc pas été effectué. Lors de ces expériences, les traitements ont été appliqués aux mêmes doses, seul l'apport journalier de ClO₂ a été augmenté pour maintenir une concentration de 0,1 ppm.

VII.2.2.4.1 Activité métabolique

L'évolution des concentrations de l'ATP dans les biofilms développés sur les substrats artificiels est présentée dans la figure 161.

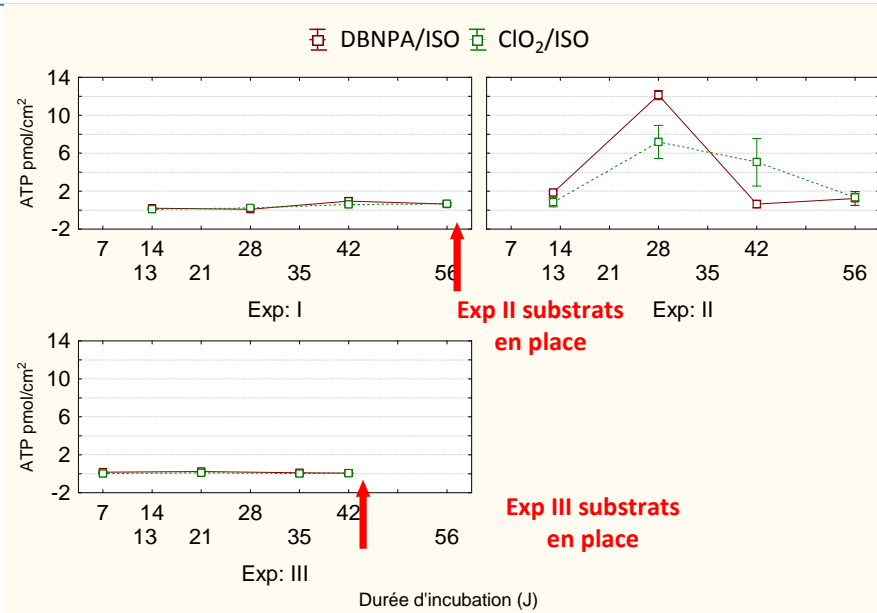


Figure 161 : Evolution des concentrations d'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms développés sur substrats artificiels sous l'effet de deux traitements biocides DBNPA/ISO et ClO₂/ISO.

Les concentrations en ATP des biofilms prélevés sur substrats artificiels sont généralement très faibles par rapport à celles enregistrées pour les biofilms des supports en place. Les résultats de la 2^{ème} expérience (II) font exception, les concentrations de l'ATP augmentent probablement en liaison avec l'élévation de la température, elle-même probablement due à une plus grande sollicitation des installations. Cette augmentation peut également être liée à l'état de contamination des surfaces des tours, représenté par les charges biologique des biofilms des substrats en places, particulièrement élevées lors de l'expérience II.

Aucune différence significative n'apparaît en liaison avec les traitements appliqués.

VII.2.2.4.2 Bactéries cultivables

L'évolution des concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms des substrats artificiels (figure 162) montre que des différences faibles s'établissent entre les deux traitements. Globalement, aucune différence significative n'apparaît en liaison avec les traitements appliqués.

On retrouve pour cet indicateur le même constat que celui fait précédemment pour l'ATP, à savoir que le niveau moyen des concentrations est nettement plus important lors de l'expérience II. Ce résultat, pourrait s'expliquer, comme pour l'ATP, par l'augmentation des températures mais aussi par un niveau de contamination des substrats en place plus important (expérience II de l'analyse des substrats en place).

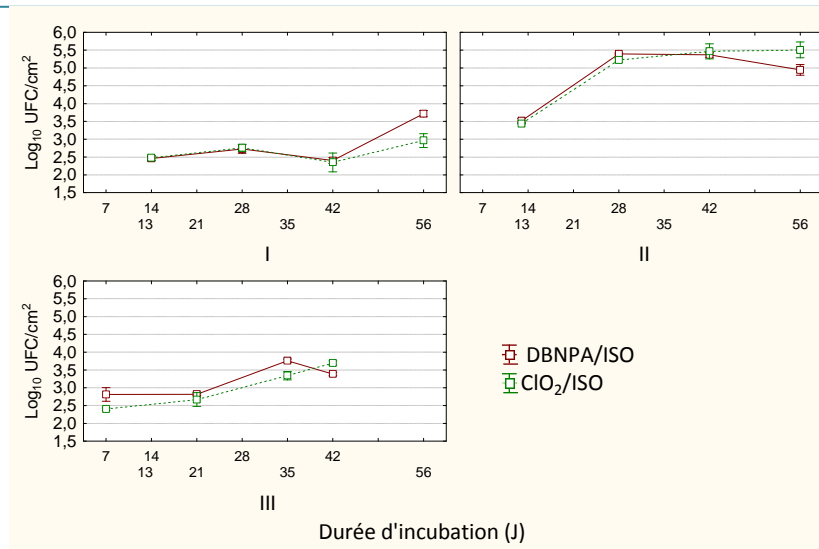


Figure 162 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log_{10} UFC/cm²) dans les biofilms développés sur des substrats artificiels sous l'effet de deux traitements biocides DBNPA/ISO et ClO₂/ISO.

VII.2.2.4.3 Bactéries totales

L'évolution des concentrations des bactéries totales dans les biofilms des substrats artificiels est présentée dans la figure 163.

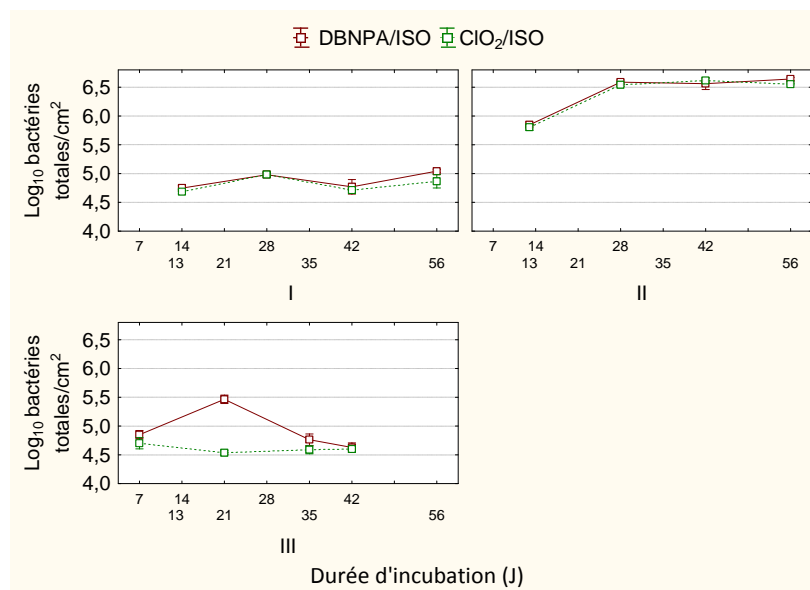


Figure 163 : Evolution des concentrations des bactéries totales dans les biofilms développés sur des substrats artificiels sous l'effet de deux traitements biocides DBNPA/ISO et ClO₂/ISO.

Les différences entre les traitements sont très peu marquées et, comme pour les indicateurs précédents, elles vont légèrement dans le sens d'une performance supérieure du couple ClO₂/ISO. Notons par ailleurs que ces concentrations, pour les deux premières expériences et quel que soit le traitement appliqué, augmentent à la fin de l'incubation. Lors de la 3^{ème} expérience ces concentrations semblent stables sous l'effet du traitement ClO₂/ISO, elles augmentent entre J7 et J21 puis diminuent entre J21 et J42 sous l'effet du traitement de référence.

En termes de différence entre les expériences, l'évolution de la concentration des "bactéries totales" est similaire à celle des bactéries cultivables et de l'ATP : les concentrations sont relativement stables tout au long des expériences, à l'exception d'un changement d'ordre de

grandeur lors de l'expérience II. Les mêmes explications que celles données pour l'ATP et les bactéries cultivables peuvent expliquer cette augmentation.

VII.2.2.4.4 *Legionella pneumophila*

Aucune forme cultivable de *L. pneumophila* n'a été détectée durant cette campagne. La bactérie a cependant été détectée ponctuellement, par immunofluorescence, au cours de l'expérience II, durant laquelle le développement des communautés bactériennes a été le plus important.

VII.2.2.4.5 Amibes

La présence d'amibes dans les biofilms des substrats artificiels n'a été détectée que lors des expériences II et III (figure 164). Comme dans le cas des indicateurs précédents, leur concentration a été plus importante durant l'expérience II.

Le rapprochement de l'évolution des concentrations des amibes avec celle de la température (figure 164-A) et de la concentration des bactéries totales (figure 164-B) fait apparaître un rôle ponctuel de ces deux variables. Cette relation a été observée par exemple au début de l'expérience II avec une augmentation simultanée des concentrations des amibes et des bactéries totales. Le même constat a été observé ponctuellement durant l'expérience III. Durant cette expérience, une diminution simultanée des concentrations des amibes, des bactéries totales mais aussi de la température a été observée entre J21 et J42.

L'effet direct ou indirect de la température peut s'expliquer par son rôle sur le métabolisme microbien. Le rôle de la concentration des bactéries trouve une explication dans le fait que les bactéries constituent le principal apport nutritif des amibes. Néanmoins l'absence de cette relation dans la tour traitée au ClO₂/ISO reste sans explication objective à ce stade de l'étude.

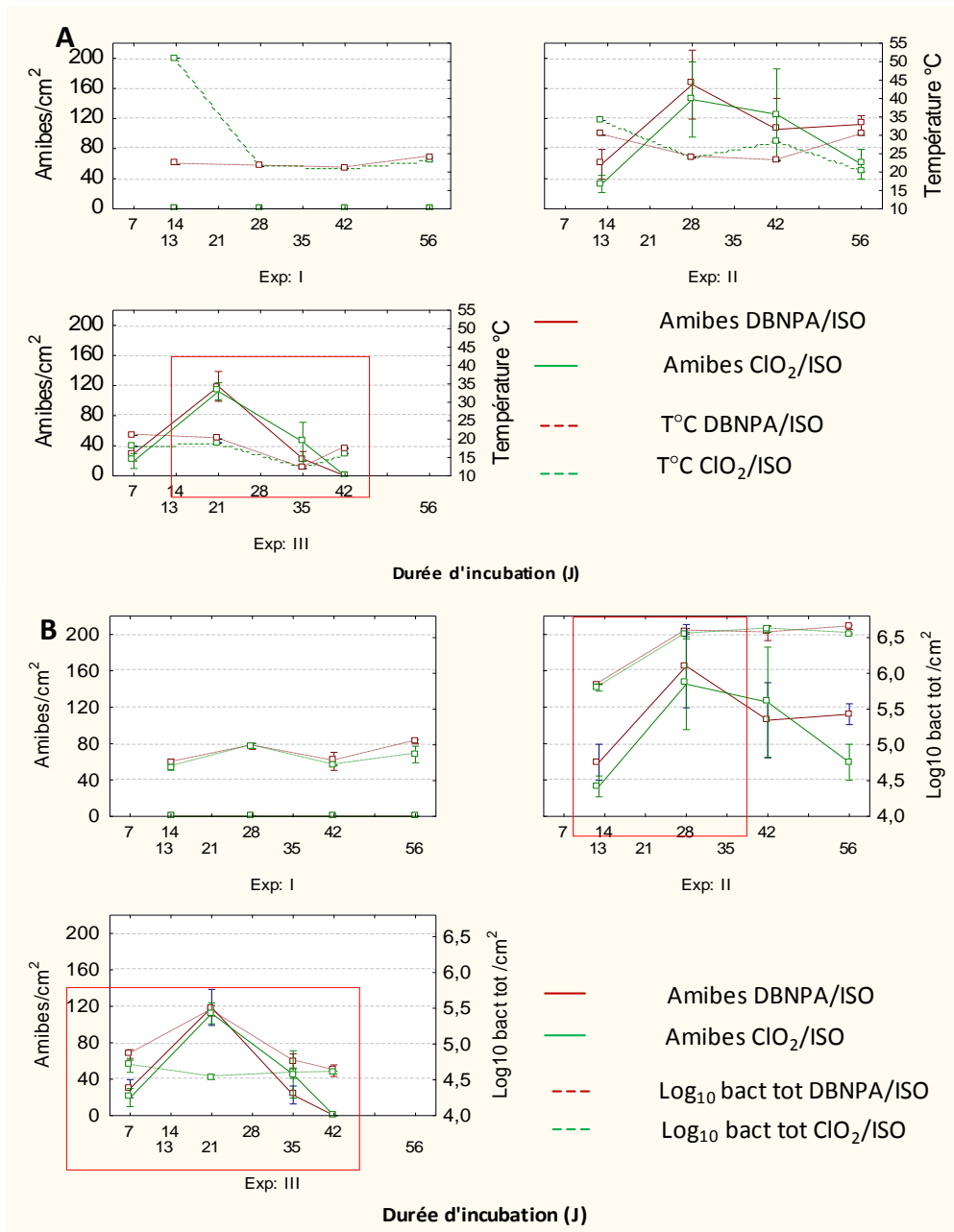


Figure 164 : Evolution des concentrations des amibes (amibes/cm², courbes continues, échelle à gauche) dans les biofilms prélevés des substrats artificiels. (A) Evolution simultanée de la température (°C) des bassins froids (courbe en pointillés, échelle à droite) et (B) évolution simultanée de la concentration des bactéries totales (Log₁₀ bact tot /cm²: courbes en pointillés, échelle à droite). Courbes rouges : traitement DBNPA/Isotiazolone, courbes verte : traitement ClO₂/Isotiazolone.

VII.2.2.5 Comparaison des résultats obtenus par l'analyse des substrats artificiels et l'analyse des substrats en place

La comparaison directe de l'analyse des biofilms développés sur les supports en place et sur supports artificiels (figure 165) n'est pas possible pour toutes les valeurs acquises puisque dans cette campagne, et contrairement à celle du site Minatec (campagne 2009), les tours n'ont pas été nettoyées entre les expériences.

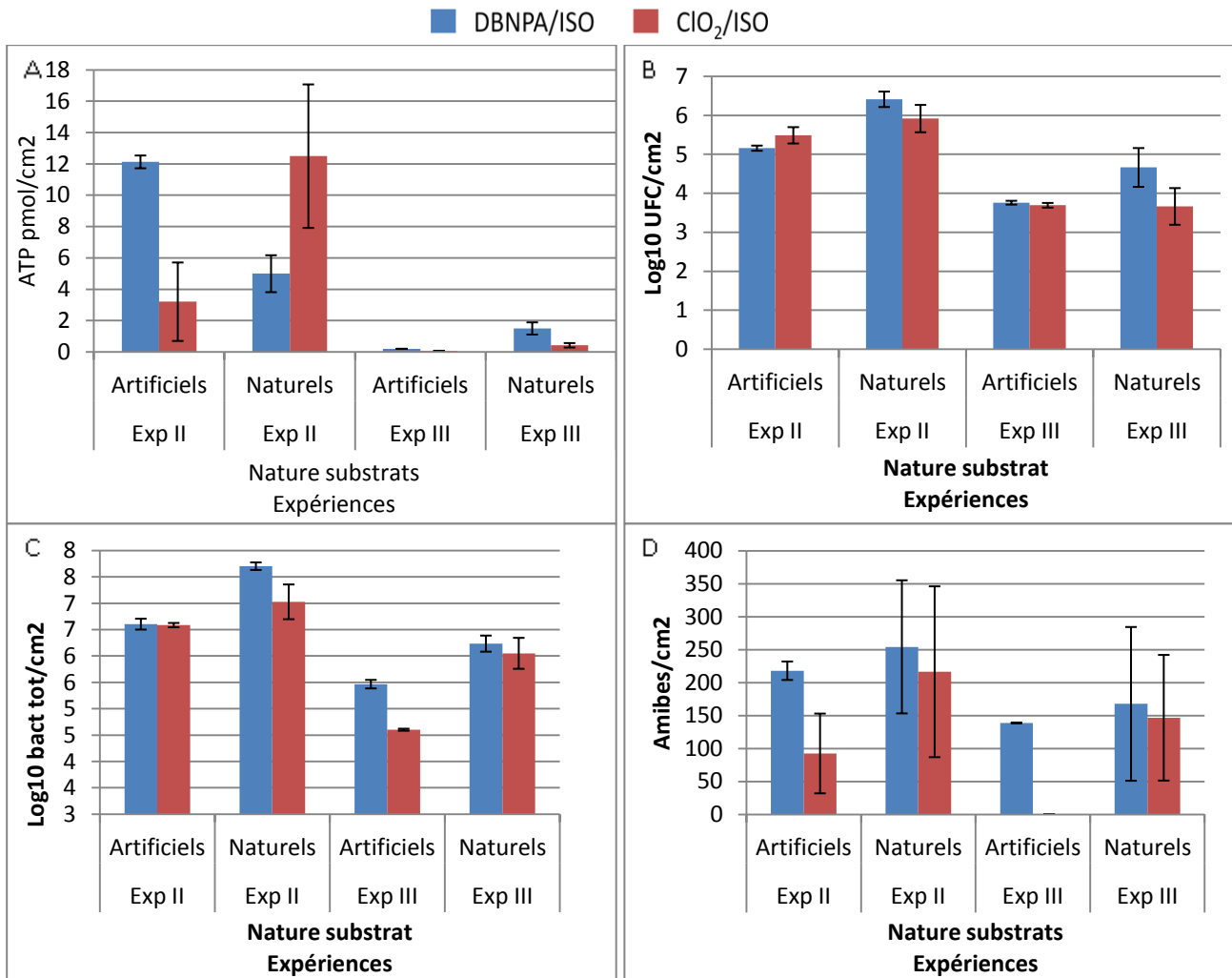


Figure 165 : Comparaison des résultats obtenus par l'analyse des biofilms prélevés sur les substrats artificiels et les substrats en place pour l'ATP (pmol/cm²) (A), les bactéries cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) (B), les bactéries totales (Log₁₀ bact tot/cm²) (C), et les amibes (D).

Une comparaison pouvait alors être envisagée sur la base des résultats obtenus pour les biofilms les plus âgés des supports artificiels, soit 56 jours, et de ceux obtenus avec les biofilms des supports en place. La figure 165 fait apparaître à ce sujet une différence quasi systématique entre les valeurs données par les deux techniques d'échantillonnage, différence significative ou non selon l'indicateur et l'expérience. Les valeurs obtenues dans le cas des substrats en place sont systématiquement plus élevées que celles des substrats artificiels.

Comme indiqué au sujet de la campagne 2009, ces différences peuvent être attribuées à la nature des supports et aux forces de cisaillement, mais auxquelles il faut ajouter ici l'âge des biofilms.

Cependant, ces résultats démontrent que le même constat peu découler de l'analyse des substrats en place et des substrats artificiels. Quelle que soit la nature du substrat analysé, la charge microbologique des biofilms diminue dans l'expérience III par rapport à l'expérience II. Cette comparaison fait apparaître également que les deux traitements ont des performances similaires sauf pour les bactéries totales. Pour cet indicateur, l'analyse des substrats en place montre que le ClO₂/ISO est plus performant, alors qu'aucune différence n'a été observée par l'analyse des substrats artificiels.

VII.2.2.6 Comparaison des résultats obtenus par l'analyse de l'eau et l'analyse des biofilms

Lors de cette campagne, l'échantillonnage de l'eau des tours aéro-réfrigérantes et celui des substrats artificiels ont été réalisés aux mêmes dates. Les valeurs de la concentration des bactéries cultivables, élément commun de leurs analyses, ont pu, ainsi, être mises en correspondance pour la comparaison des performances des deux traitements (figure 166).

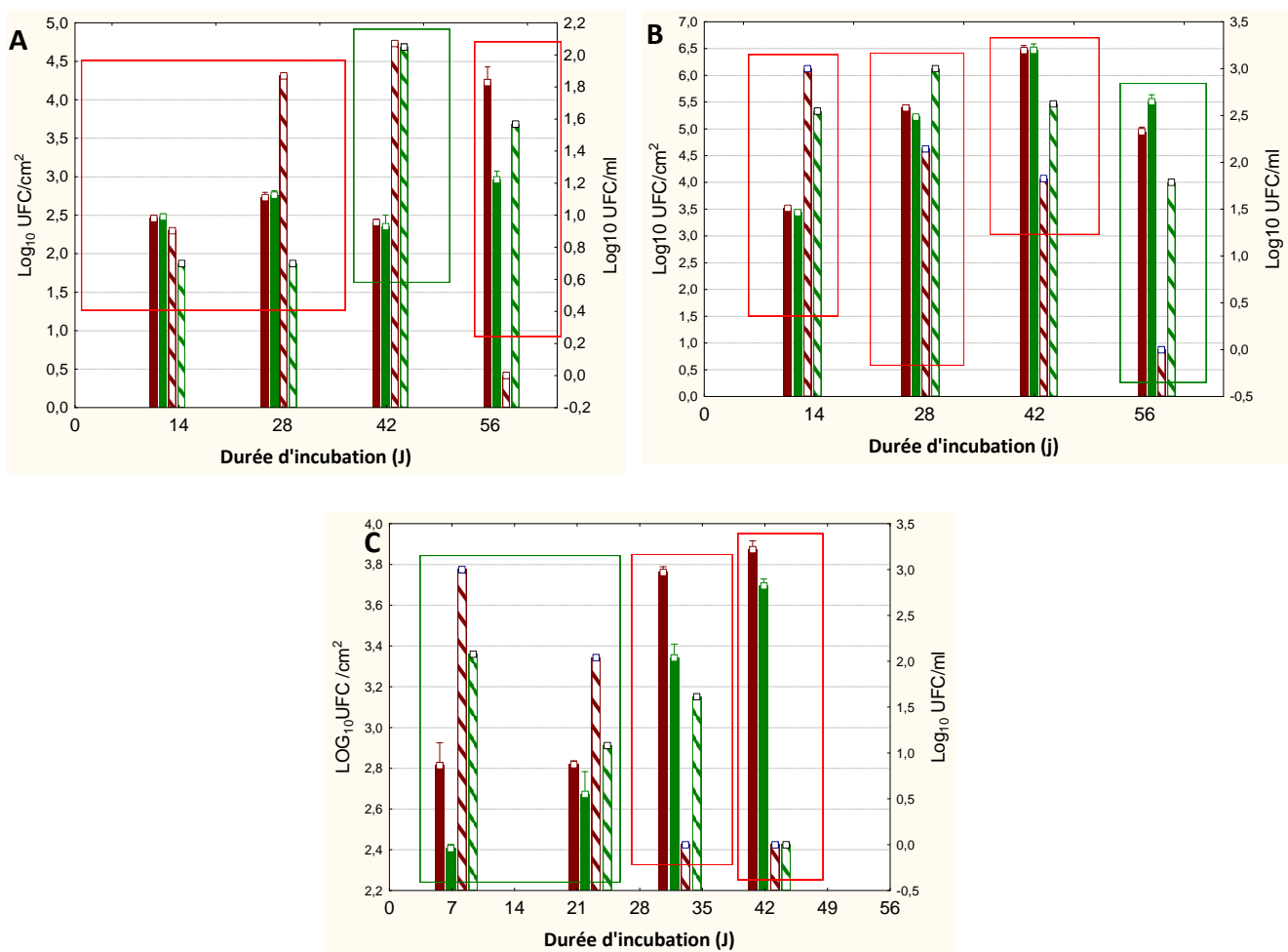


Figure 166 : Comparaison des performances des traitements DBNPA/ISO (remplissage rouge) et ClO₂/ISO (remplissage vert) vis-à-vis des bactéries cultivables en suspension (remplissage hachuré) et fixées (remplissage uniforme) sur les substrats artificiels (A) expérience I, (B) expérience II, (C) expérience III.

La comparaison de l'analyse de l'eau et des biofilms n'aboutit pas aux mêmes conclusions en termes de performances des biocides et d'évolution des concentrations des bactéries cultivables. L'analyse de l'eau montre des résultats contradictoires à ceux obtenus par l'analyse des biofilms en termes de performance des biocides (résultats entourés de carrés rouges). Les informations apportées par cette comparaison viennent confirmer, ici, dans le contexte des TARs, le caractère

"tamponné" de l'indicateur microbien mesuré dans les biofilms. La concentration des bactéries cultivables en suspension est rapidement influencée, dans le contexte des TARs, par l'état de contamination de l'eau refroidissement et la purge alors que celle des biofilms l'est moins.

Les populations bactériennes fixées sont en effet plus stables que celles qui sont en suspension dans l'eau, notamment à une échelle de temps plus grandes. L'inertie relative des biofilms devient un avantage en donnant une image moins bruitée des processus en cours d'évolution. Dans le contexte des TARs, la stabilité des bactéries fixées est probablement liée, pour partie, à un effet tampon que joue la structure des biofilms vis-à-vis des changements environnementaux qui sont principalement la salinité de l'eau et, bien entendu, de la concentration des biocides.

L'ensemble de ces éléments, dans le contexte des TARs étudiées, explique les différences observées entre la situation des bactéries cultivables donnée par l'eau et celle donnée par les biofilms. À ce sujet la figure 167 vient confirmer le fait que les coefficients de variation (CV) associés à la moyenne de la concentration des bactéries et aux écarts types, d'une part et associés aux médianes et aux MAD (Median Absolute Deviation), d'autre part, sont plus grands dans le cas des échantillons d'eau que dans celui des échantillons de biofilms. Le contraste est encore plus grand dans le cas des coefficients calculés à partir et des médianes et des MAD.

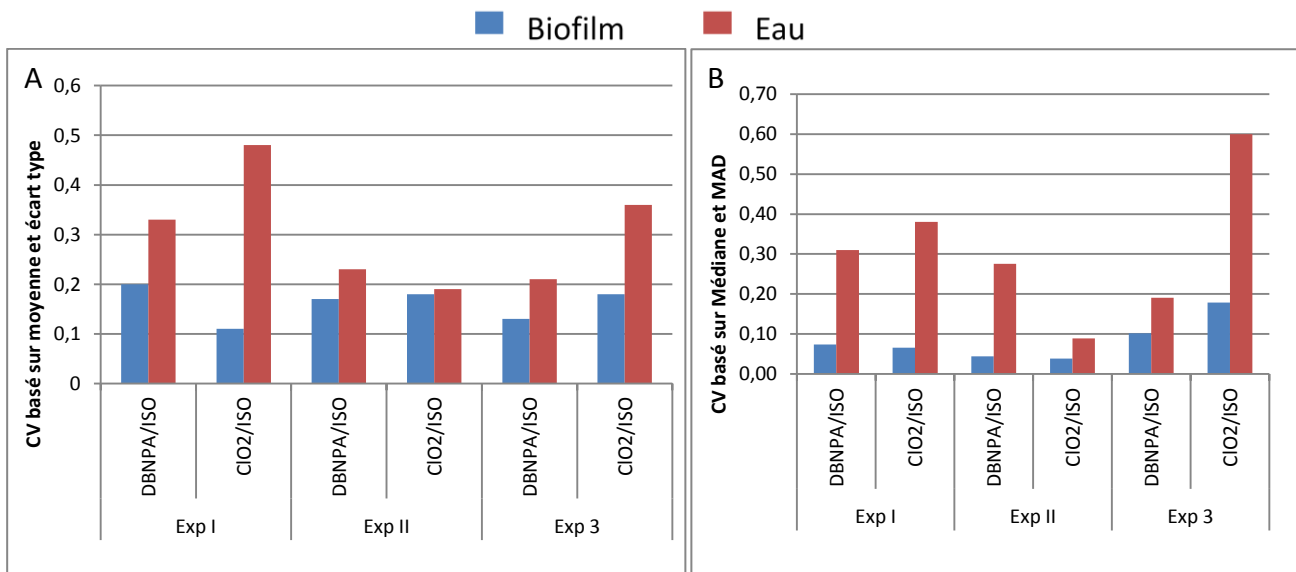


Figure 167 : Comparaison des coefficients de variations calculés à partir d'écarts types et de moyennes (A), d'une part, et à partir des médianes et des MAD (B), d'autre part. Le jeu de données est celui des concentrations en bactéries cultivables de l'eau et des biofilms développés sur substrat artificiel durant la campagne 2010.

VII.2.3 Campagne d'essais de 2011

VII.2.3.1 Caractéristiques des traitements

Cette campagne a été menée sur le même site que la campagne précédente (bâtiment du CG38) mais sur la base de l'application du traitement Securox seul (sans addition d'isothiazolone) sur une tour et du traitement Perox sur l'autre tour.

En outre, cette campagne a bénéficié d'une collecte de données plus importante sur le plan des indicateurs chimiques. L'évolution des concentrations des deux biocides a été tracée à partir de relevés ponctuels réalisés les jours de prélèvement. Elle ne représente donc pas toute l'évolution effective des concentrations des biocides

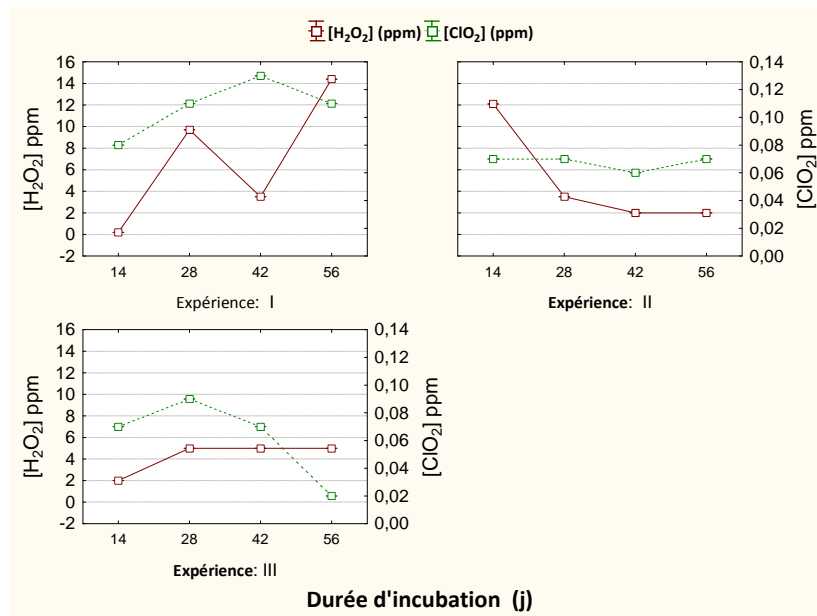


Figure 168 : Évolution des concentrations de ClO_2 (courbe vertes, échelle à droite) et d' H_2O_2 (courbes rouges, échelle à gauche) dans les bassins froids au cours des trois phases de la campagne.

L'objectif initial de la campagne en termes de traitements, était de 0,1 ppm pour le ClO_2 et de 20 ppm pour le couple H_2O_2 /UV. L'évolution des concentrations des biocides, présentée dans la figure 168, montre que la concentration du ClO_2 a été plus au moins stable avec des écarts acceptables. Ce maintien a néanmoins été obtenu par un accroissement considérable (60%) du flux d'injection entre les expériences I et II (figure 169) pour tenir compte des pertes par 'stripping'.

Dans le cas du peroxyde d'hydrogène, les concentrations moyennes sont restées loin de la consigne, probablement à cause de la sélection et de l'accroissement de la proportion de bactéries adaptées au stress oxydatif (bactéries catalase⁺ et/ou SOD⁺), un processus bien connu dans les installations traitées en permanence par le peroxyde d'hydrogène. L'augmentation progressive du flux de l' H_2O_2 renforce ce constat (figure 169).

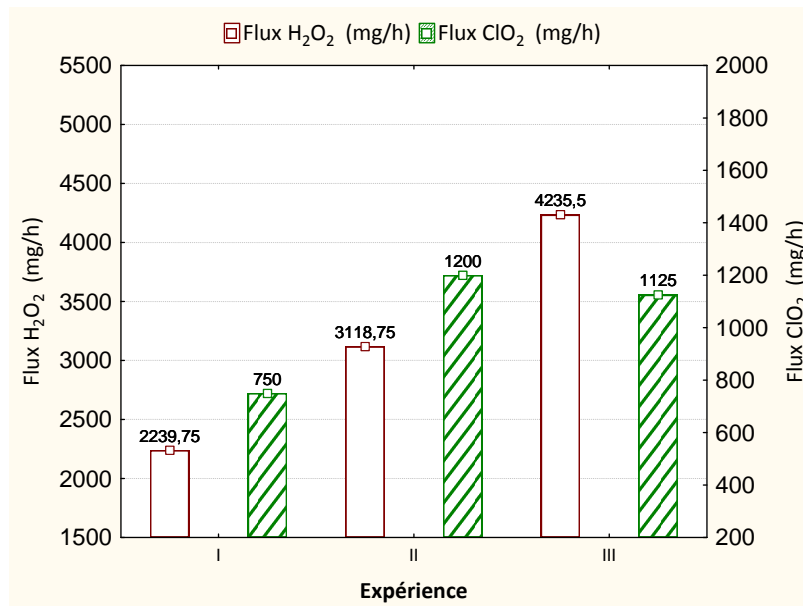


Figure 169 : Flux moyen d'injection de ClO₂ (remplissage hachuré) et d'H₂O₂ (remplissage uniforme) durant chacune des trois phases de la campagne.

Deux lampes UV-c ont été utilisées pour le traitement H₂O₂/UV successivement à deux puissances différentes, en l'occurrence 55 W-électrique (110 au total) au cours des expériences I et II et 33 W-électrique (66 au total) au cours de l'expérience III.

Le tableau 53 résume les caractéristiques des traitements biocides lors des 3 expériences de traitement.

Tableau 53 : Rappel des valeurs caractéristiques des traitements (moyennes par expérience).

Expériences	[H ₂ O ₂] (mg/L)	Flux H ₂ O ₂ (mg/h)	Puissance électrique (W) des lampes UV	[ClO ₂] (mg/L)	Flux ClO ₂ (mg/h)
I	7,0	2240	110	0,11	750
II	4,9	3119	110	0,07	1200
III	4,3	4236	66	0,08	1500

VII.2.3.2 Evolution des températures des bassins froids

L'évolution des températures enregistrées dans les bassins froids des tours est présentée dans la figure 170. La figure 170-A montre que les trois expériences n'ont pas été équivalentes sur le plan de la température : elle s'est accrue au cours des expériences I et II traduisant leur sollicitation pour la climatisation du bâtiment, dans une phase croissante de la température atmosphérique. Cette figure montre également qu'il y a une relation étroite entre l'évolution des puissances échangées par les tours et les températures enregistrées dans les bassins froids. Ces deux paramètres sont en effet des indicateurs du fonctionnement des tours.

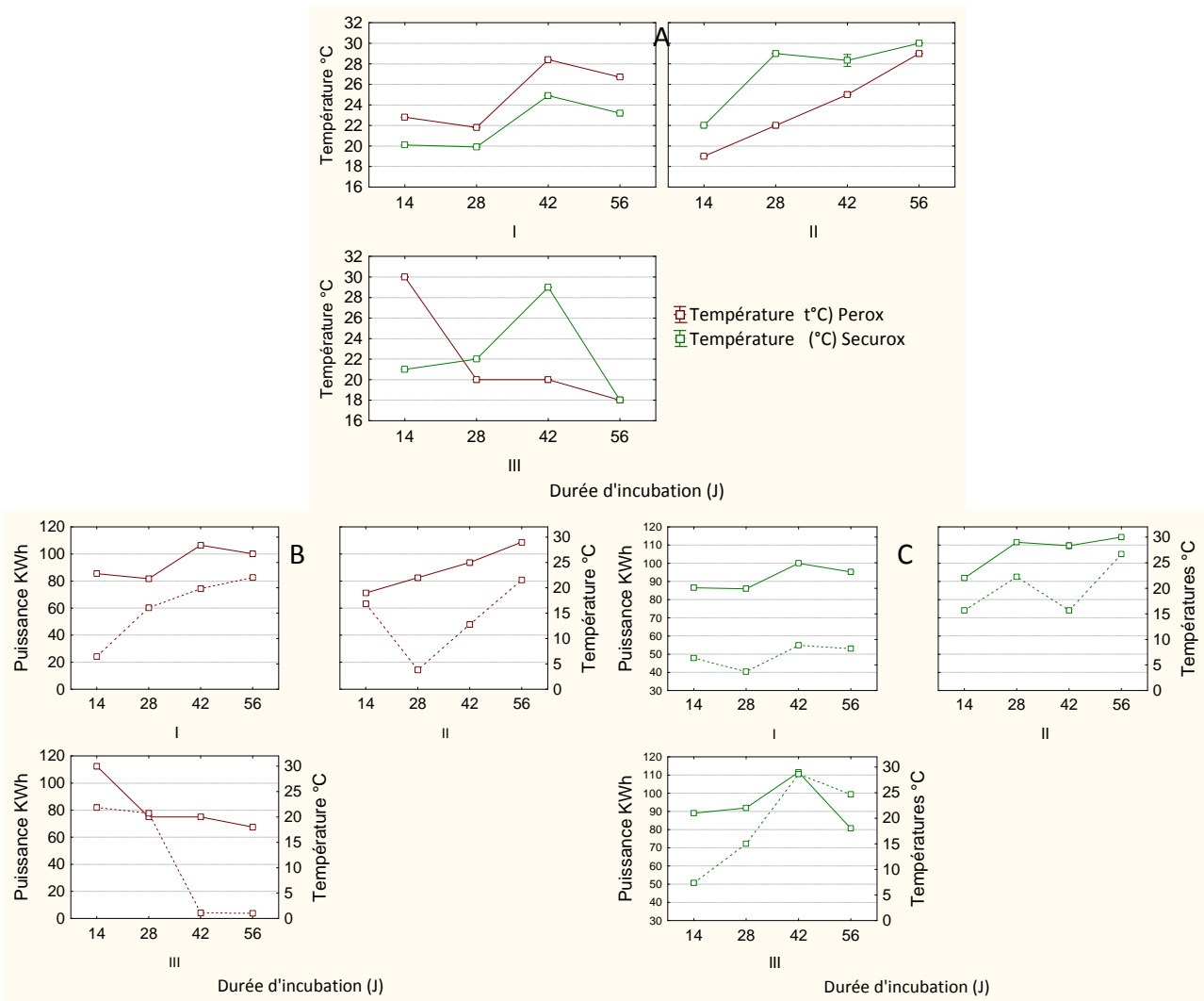


Figure 170 : (A) Evolution des températures (°C) enregistrées dans les bassins froids des tours, (B) Evolution simultanée des températures enregistrées dans le bassin froid la puissance échangée (kWh) dans la tour PEROX, (C) Evolution simultanée des températures enregistrée dans le bassin froid la puissance échangée dans la tour SECUROX. Courbe rouge : tour Perox, courbe verte : tour Securox. Courbe continue : température, courbes en pointillés : puissance.

La figure 171 montre le positionnement des dates d'échantillonnage dans la chronologie de la sollicitation des tours et les puissances moyennes échangées par les deux tours durant les trois expériences.

L'observation des moyennes des puissances échangées par les deux tours (figure 171-D) montre que la tour Perox a été plus sollicitée durant la première expérience alors que c'est la tour Securox qui l'a été durant les deux dernières expériences.

Le fonctionnement des tours a été moins régulier et dissymétrique (évolution inverse entre les deux tours), au cours de la 3^{ème} expérience. De plus, les amplitudes thermiques ont été conséquentes, de 15°C, notamment pour la tour Perox.

La connaissance de ces variations est importante pour l'interprétation de l'évolution des populations bactériennes de l'eau et des biofilms. La sollicitation des tours en termes de puissance échangée, et l'accroissement de la température qu'elle induit ont pour incidence :

- un effet a priori positif sur la multiplication des bactéries par une action directe sur leur métabolisme ;

- un effet indirect sur la concentration des charges minérales et organiques de l'eau de la tour. Pour les bactéries, les conséquences de cette concentration peuvent être positives ou négatives ; positives quand elle concerne la charge organique mais négatives quand elle concerne les minéraux et les biocides ;
- un effet indirect sur les bactéries planctoniques en liaison avec les processus de déconcentration des tours, phénomène déjà évoqué à propos de la campagne 2010.

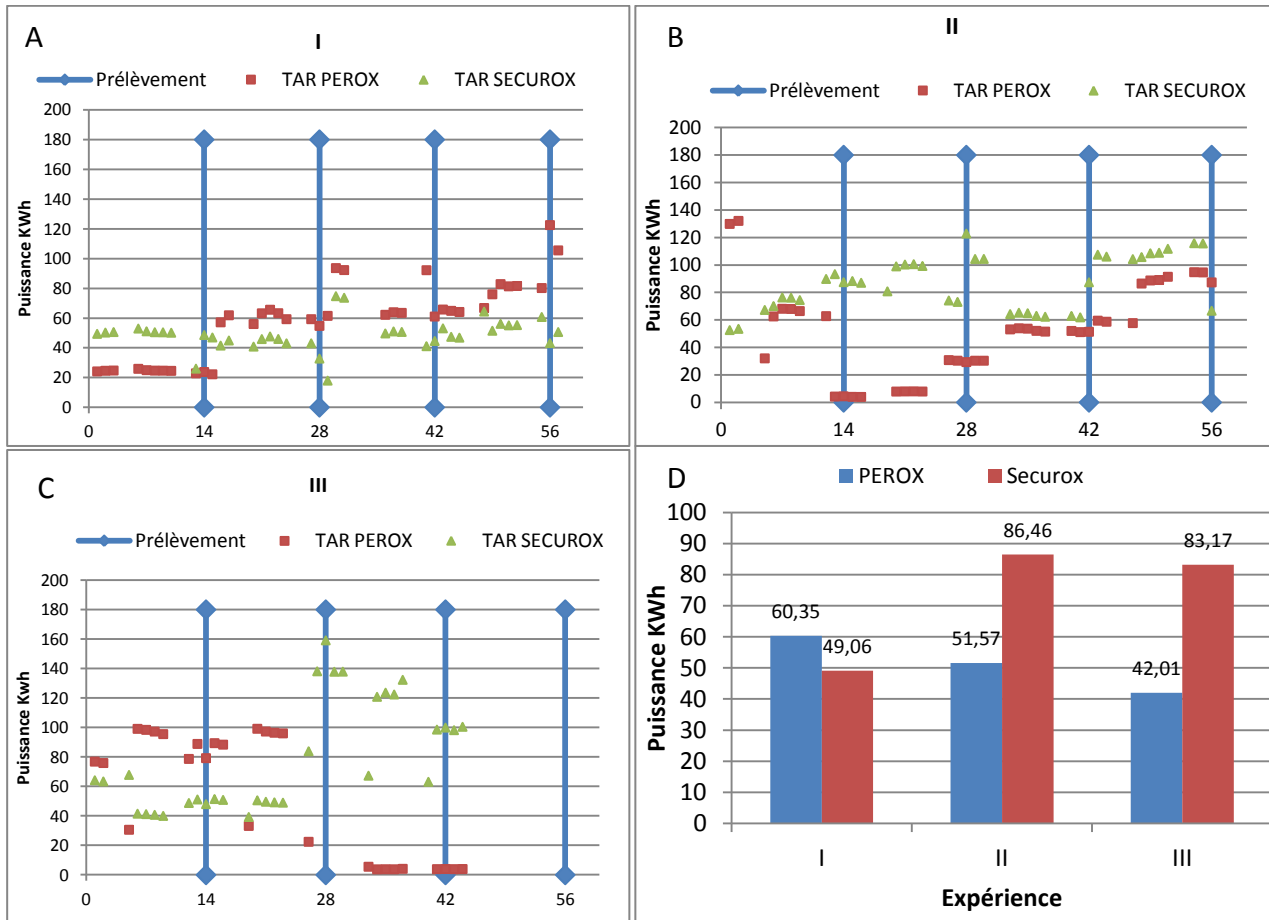


Figure 171 : Puissances échangées dans les tours de refroidissement lors des expériences I (A), II (B) et III (C). (D) : moyennes des puissances échangées par tour lors des 3 expériences.

VII.2.3.3 Biofilms des substrats en place

Trois prélèvements sur les substrats en place ont été réalisés durant cette campagne. Pour rappel ces prélèvements ont été réalisés à la fin de chaque phase d'expérience, en correspondance avec les derniers prélèvements des substrats artificiels de la même expérience.

VII.2.3.3.1 Activité métabolique

Les concentrations d'ATP des biofilms des tours traitées au ClO_2 et à $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ sont présentées dans la figure 172.

Cette figure montre que la distinction des traitements durant les deux 1^{ères} expériences n'est possible que sur la base des concentrations de l'ATP des parois (murs). Ces concentrations sont plus élevées dans la tour traitée au ClO_2 durant la 1^{ère} expérience et dans la tour Perox durant la 2^{ème} expérience. Dans l'ensemble, les résultats montrent que la concentration en ATP des biofilms est plus forte durant l'expérience I par comparaison aux expériences II et III, un résultat qui traduit probablement le fait que cette expérience a été consacrée à l'ajustement des traitements au

contexte des tours notamment par l'augmentation des flux des deux biocides. Les valeurs significativement plus petites de l'expérience II pourraient être interprétées comme le résultat positif de ces ajustements et ce d'autant plus que la sollicitation de la tour "Securox" notamment, passe par un maximum durant cette période. La 3^{ème} partie de la figure montre que le procédé Securox conserve sa performance durant l'expérience III, alors que, dans le même temps, celle du traitement Perox se dégrade bien que le flux d'H₂O₂ ait été augmenté et qu'elle soit moins sollicitée. La diminution pour moitié de l'irradiation UV (de 110 W-électrique à 66 W-électrique) pourrait en être la cause par la diminution de la production d'OH[•] à laquelle est associée la diminution de leur action de minéralisation de la matière organique.

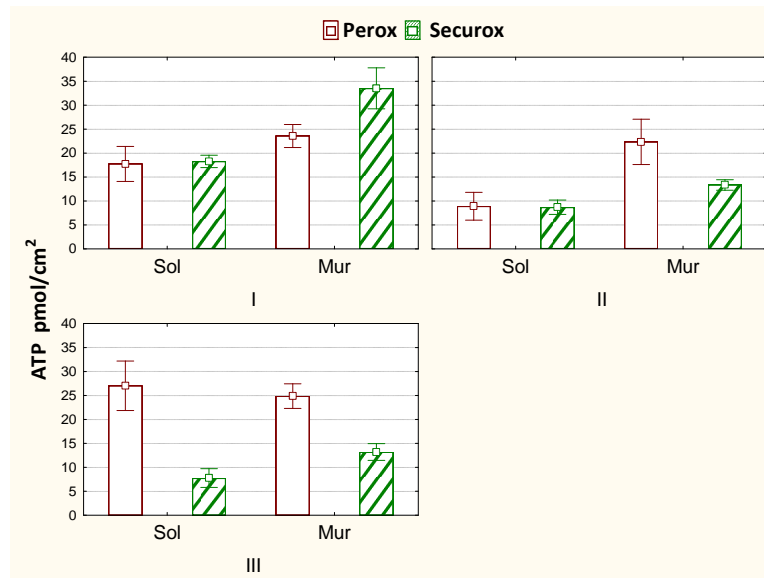


Figure 172 : Concentrations de l'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms prélevés de la tour traitée au ClO₂ : remplissage hachuré, et à l'H₂O₂/UV : remplissage uniforme

Considérés du point de vue des sites d'échantillonnage, les résultats font apparaître, à une exception près, des différences systématiques et significatives, dans chacune des TARs, entre les échantillons du fond et ceux des parois. C'est sur ces dernières que les valeurs d'ATP les plus fortes ont été enregistrées. Pour tenir compte de cette observation, la comparaison des traitements doit donc se faire par site d'échantillonnage et si l'on ne tient pas compte de l'expérience d'ajustement des traitements (1^{ère} expérience) c'est le procédé Securox qui apparaît le plus performant en particulier lors de l'expérience II.

VII.2.3.3.2 Bactéries cultivables

L'évolution des concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms sont présentées dans la figure 173. L'analyse globale de l'ensemble des résultats qui a été faite pour l'ATP, s'applique ici aux bactéries cultivables : les concentrations des bactéries cultivables sont plus élevées durant la 1^{ère} expérience par comparaison aux deux dernières expériences. L'efficacité des procédés ne semble pas avoir été optimale lors de la 1^{ère} expérience (figure 173). Les résultats de l'expérience II témoignent d'une meilleure performance des deux traitements et l'expérience III, d'une perte d'efficacité dans les deux cas, mais nettement plus marquée dans celui du procédé Perox, alors que la puissance échangée pour cette tour est en diminution et que le flux d'H₂O₂ est en augmentation. Il faut rappeler, cependant, qu'il s'agit de l'expérience pour laquelle l'irradiation UV avait été réduite de moitié.

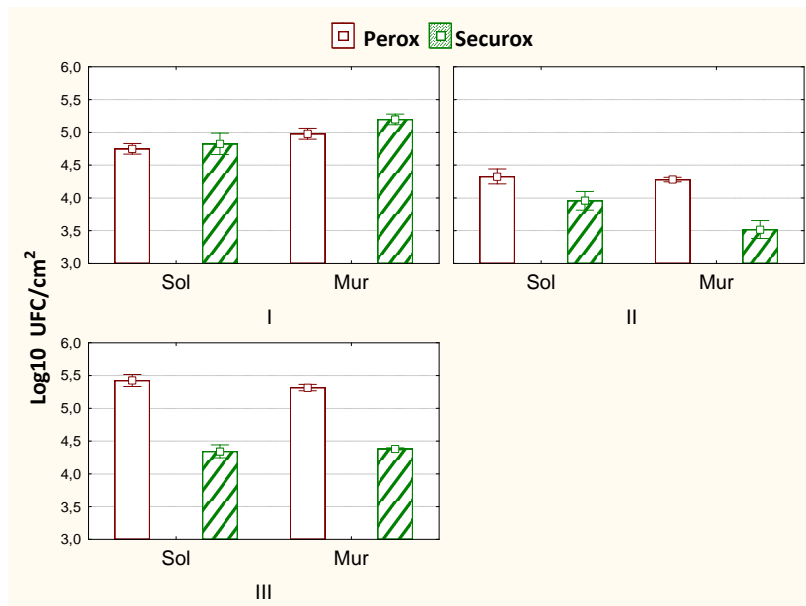


Figure 173 : Concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms prélevés de la tour traitée au ClO₂ (remplissage hachuré) et à l'H₂O₂/UV (remplissage uniforme)

VII.2.3.3 Bactéries totales

Les concentrations des bactéries totales dans les biofilms sont présentées dans la figure 174.

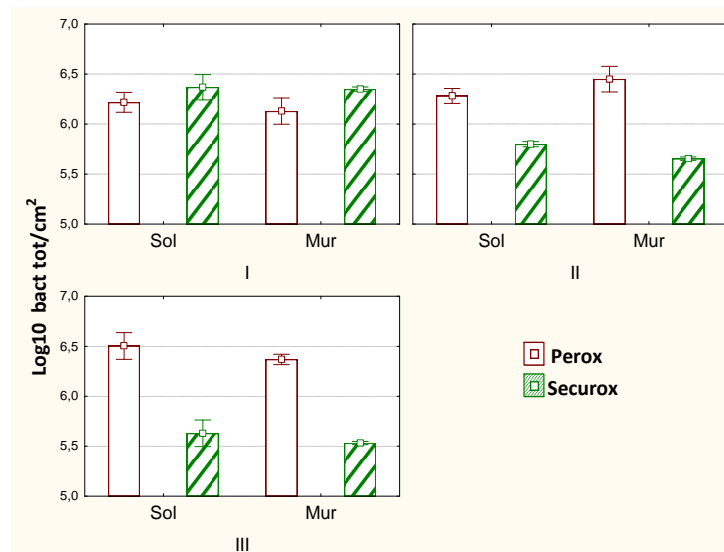


Figure 174 : Concentrations des bactéries totales dans les biofilms prélevés de la tour traitée au ClO₂ (remplissage hachuré) et à l'H₂O₂/UV (remplissage uniforme)

L'analyse faite au sujet des deux indicateurs précédents, s'applique ici pour les bactéries totales de la tour Securox : une faible performance durant la première expérience qui s'améliore par la suite durant les deux expériences suivantes notamment sous l'effet des ajustements du traitement appliqué. Les résultats de cette analyse (figure 174) sont très proches de ceux donnés par les deux indicateurs précédents. Une moindre variabilité a été observée avec les valeurs de la tour Perox où le niveau des "bactéries totales" apparaît quasi constant, d'une expérience à l'autre. Le fait remarquable, est la diminution dans le même temps, de la concentration de ces bactéries dans la tour "Securox". Cette observation suggère une meilleure performance du traitement Securox également vis-à-vis des bactéries totales, traitement qui impacte non seulement le développement des bactéries mais aussi leur élimination physique.

VII.2.3.3.4 Recherche de *L. pneumophila* et des amibes

Aucune forme de *L. pneumophila* n'a été détectée dans les biofilms des deux tours durant les trois expériences de cette campagne, quelle que soit la technique employée. Les concentrations des amibes dans les biofilms des deux tours sont présentées dans la figure 175.

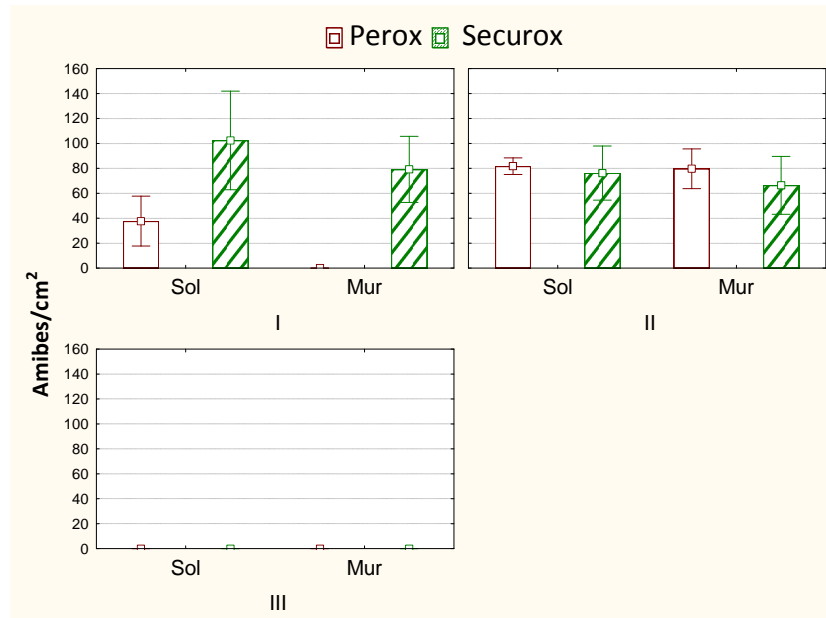


Figure 175 : Concentrations des amibes dans les biofilms prélevés de la tour traitée au ClO₂ (remplissage hachuré) et à l'H₂O₂/UV (remplissage uniforme)

Des valeurs non négligeables de concentration d'amibes ont cependant été enregistrées dans la tour Securox au cours la 1^{ère} expérience et dans les deux tours au cours de la 2^{ème} expérience (figure 175), valeurs difficiles à interpréter du fait de l'absence apparente de relation avec les populations bactériennes ou avec la température de l'eau. La concentration des amibes nettement plus faible dans la "tour Perox" durant la 1^{ère} expérience, ne permet plus de discriminer les deux traitements dans les expériences suivantes.

VII.2.3.4 Biofilms des substrats artificiels

Pour rappel, des lames de verre neuves sont disposées dans les tours au début de chaque expérience. L'information supplémentaire apportée est donc, entre autre, celle d'un taux de croissance des biofilms.

VII.2.3.4.1 Activité métabolique

L'évolution des concentrations d'ATP dans les biofilms des substrats artificiels sous l'effet des traitements biocides H₂O₂/UV et le ClO₂ est présentée dans la figure 176.

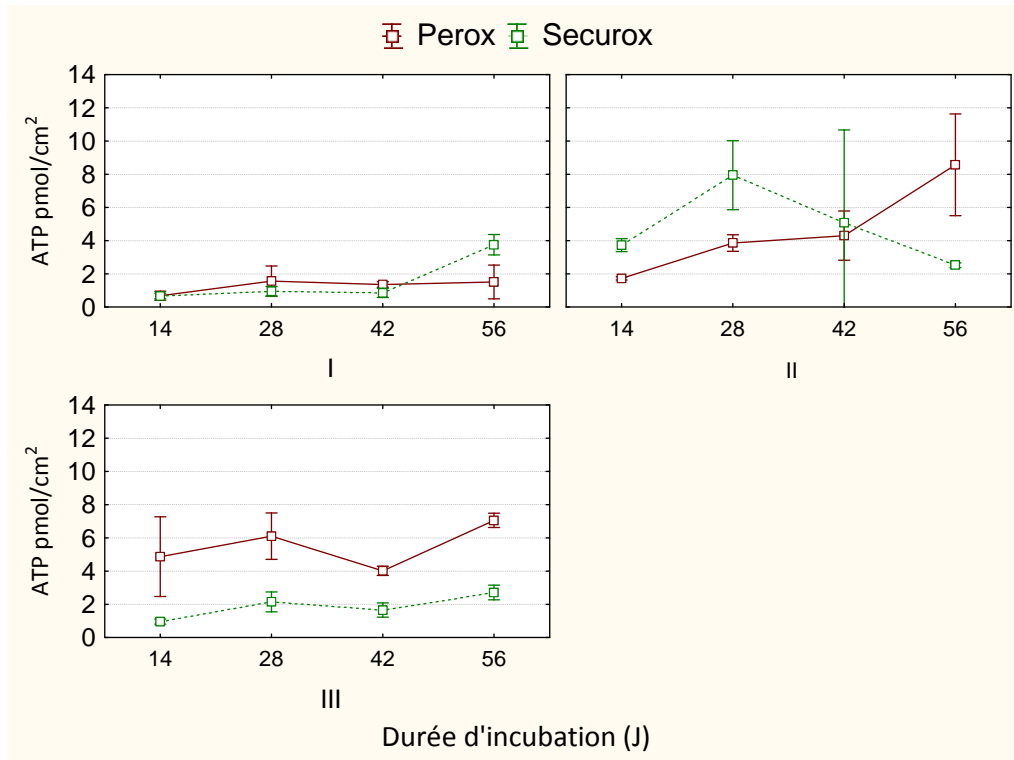


Figure 176 : Evolution des concentrations en ATP (pmol/cm²) des biofilms développés sur substrats artificiels et soumis aux traitements Perox (courbes rouges) et Securox (courbes vertes).

En aval de la phase de colonisation initiale des lames (entre J0 et J14) aucune véritable augmentation de la concentration d'ATP ne se produit, à l'exception de la tour Perox durant l'expérience II. Durant la 2^{ème} expérience, les concentrations d'ATP augmentent dans les deux tours, probablement en relation avec le degré élevé de colonisation des tours à la fin de l'expérience précédente. Cependant ces concentrations diminuent dans la tour Securox durant la 2^{ème} moitié de l'expérience II puis se maintiennent à des valeurs très basses tout au long de la 3^{ème} expérience. Dans la tour PEROX ces concentrations continuent leur progression durant l'ensemble de l'expérience II et se maintiennent à des valeurs plus élevées que celle de la tour Securox.

Le résultat de l'expérience III dans la tour Perox, peut s'expliquer également par un degré de colonisation élevé en amont de l'expérience II et une perte d'efficacité du procédé, elle-même due à l'adaptation des bactéries au stress oxydatif et à la diminution des radiations UV de 110 W à 66 W durant la 3^{ème} expérience.

VII.2.3.4.2 Bactéries cultivables et bactéries totales

Les graphiques représentant l'évolution des concentrations de l'ensemble des bactéries et des bactéries cultivables dans les deux tours ont été regroupés ici (figure 177) en raison d'une double similitude :

- 1- celle des évolutions dans le temps des deux types de bactéries qui indique que le rapport entre les deux indicateurs, représentant le pourcentage des bactéries cultivables ne semble pas varier, tout au moins, dans une large mesure
- 2- celle des évolutions entre les deux tours, c'est-à-dire entre les deux traitements, ce qui confirme le fait que leurs performances ont été proches.

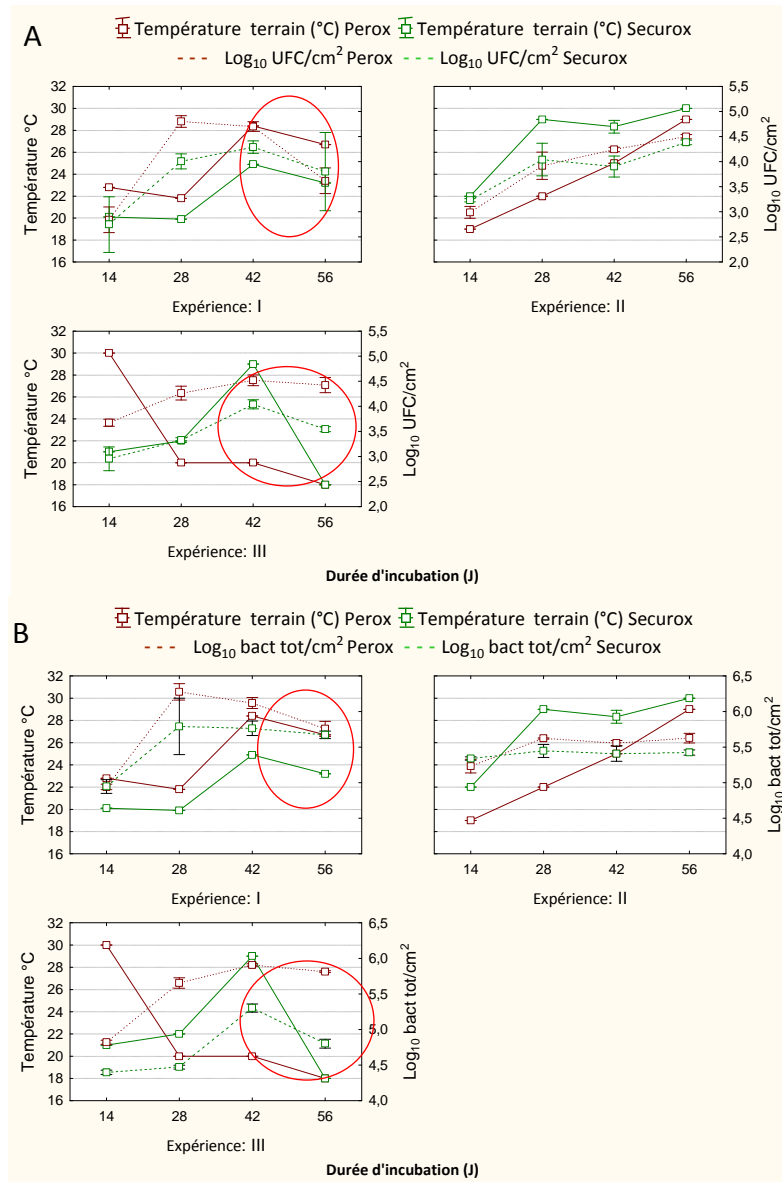


Figure 177 : Evolutions simultanées des concentrations (A) des bactéries cultivables ($\text{Log}_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$) (B) des "bactéries totales" ($\text{Log}_{10}\text{N}/\text{cm}^2$) (courbe en pointillés) et des températures (A et B) des bassins froids (courbe continue).
Tour traitée par le Perox (courbes rouges) et tour traitée par le Securox (courbes vertes).

Globalement, les concentrations des bactéries cultivables et totales augmentent durant la première moitié de la durée d'incubation pour atteindre un maximum en général à 28 jours. Ces concentrations se stabilisent relativement par la suite jusqu'à la fin des expériences.

L'augmentation de la concentration des bactéries dans les biofilms est un processus naturel durant lequel le biofilm se développe jusqu'à maturité. L'observation de ces résultats montre que ces biofilms arriveraient à maturité dès 28 jours d'incubation. Néanmoins, dans les expériences I et III, les concentrations de bactéries cultivables diminuent au derniers prélèvement. Ce constat est également observé pour les bactéries totales lors de l'expérience III. Ce phénomène pourrait s'expliquer en liaison avec la décroissance des biofilms par l'érosion due aux forces de cisaillement, intenses dans les tours de refroidissement.

L'évolution attendue des indicateurs, sur la base de taux de croissance réduits par l'effet des biocides et sous réserve que les autres conditions environnementales soient constantes, devrait

conduire à une lente augmentation de l'épaisseur du biofilm vers un niveau d'équilibre lié aux forces de cisaillement et plus généralement aux turbulences auxquelles le biofilm est soumis. C'est effectivement le modèle observé sur la plupart des graphiques des expériences I à III.

La sollicitation des tours n'a pas été constante durant les 2 mois qu'ont duré chacun des expériences, et par conséquent les conditions de température sous lesquelles les lames ont été incubées n'ont pas été constantes également. Nous avons donc essayé de rapprocher l'évolution de la température des bassins froids avec celle des concentrations de bactéries (figure 177).

Il apparait ainsi quelques correspondances (évolutions conjointes et dans le même sens) entre l'évolution de la température et celle des bactéries, correspondances qui témoignent d'un rôle sans doute prépondérant de la température dans certaines phases de l'évolution des populations. On note d'ailleurs, que ces correspondances s'établissent plus souvent avec les bactéries cultivables qu'avec les bactéries totales.

VII.2.3.4.3 Amibes

L'évolution des concentrations d'amibes dans les biofilms des substrats artificiels est présentée dans la figure 178. On note, ici, que, lors des premiers prélèvements, les concentrations des amibes sont nulles ou très faibles et augmentent ensuite probablement en relation avec l'augmentation des concentrations des bactéries. À l'exception de l'expérience III, la concentration en amibes de la "tour Securox" est plus fréquemment inférieure à celle observée dans la "tour Perox". Cependant, les différences ne sont significatives que lors de l'expérience I.

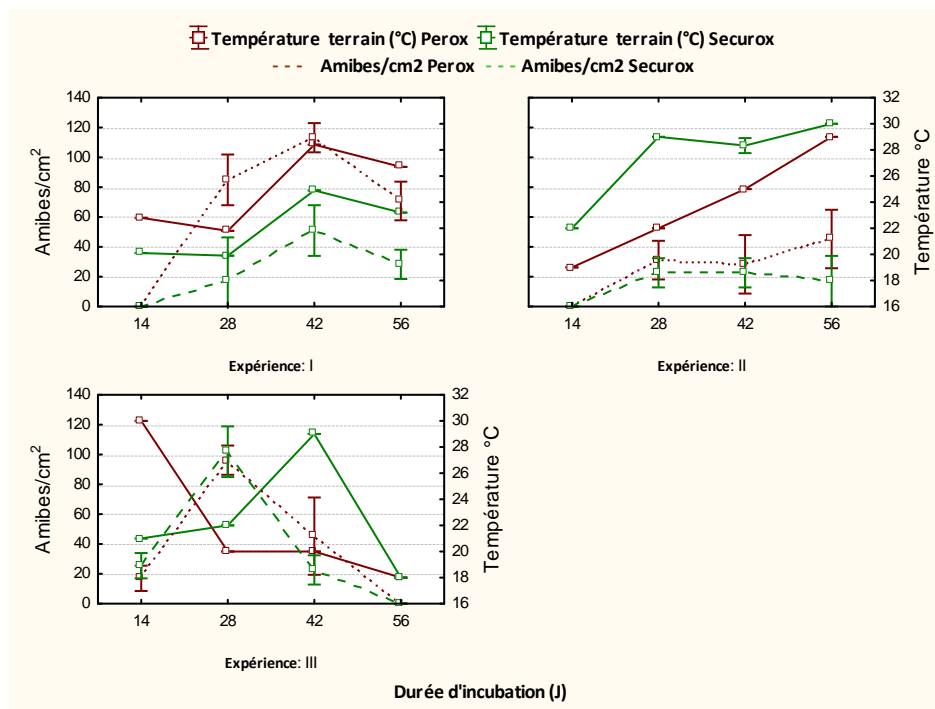


Figure 178 : Evolutions simultanées de la concentration en amibes (courbes pointillées) et de la température des bassins froids (courbes continue) dans la tour traitée par le Perox (courbe rouge) et la tour traitée par le Securox (courbes vertes)

Afin d'aider à l'interprétation de leur évolution dans le temps, les variations des concentrations en amibes sont représentées simultanément à celles de la température des bassins froids (figure 178). La figure apporte la démonstration du fait que l'évolution des amibes et celle de la température semblent assez bien corrélées lors de la 1^{ère} expérience. Cette relation se dégrade lors de la 2^{ème} expérience, pour être quasi absente lors de la 3^{ème} expérience. En effet les concentrations des amibes les plus élevées ont été détectées à température élevée. La fin de la 3^{ème} expérience est

marquée par une forte baisse de la température, qui serait à l'origine de la baisse des concentrations d'amibes.

Aucune corrélation entre les concentrations des biocides et celles des amibes n'a été mise en évidence. Les traitements peuvent néanmoins avoir influencé indirectement les concentrations d'amibes par leur action sur le degré de colonisation bactérienne de la tour.

VII.2.3.4.4 Analyse particulière de la vitesse initiale de colonisation des supports artificiels en tant qu'indicateur de la performance des traitements

Les vitesses initiales de colonisation des lames est, elle aussi, intéressante à considérer. Elle est informatrice de l'influence des conditions sur la multiplication des bactéries auxquelles participe l'effet des biocides mais également l'état de contamination des tours. Les vitesses de colonisation correspondent aux pentes des courbes représentant la croissance des biofilms sur les supports artificiels. La croissance des biofilms à laquelle correspond l'augmentation des concentrations des indicateurs biologiques se poursuit dans certains cas jusqu'à 28 jours d'incubation pour atteindre un plateau. Ce plateau est parfois atteint dès 14 jours d'incubation. Pour des raisons d'homogénéité, les taux de colonisation initial ont donc été calculés entre 0 et 14 jours d'incubation pour l'ATP, les bactéries cultivables et les bactéries totales (figure 179).

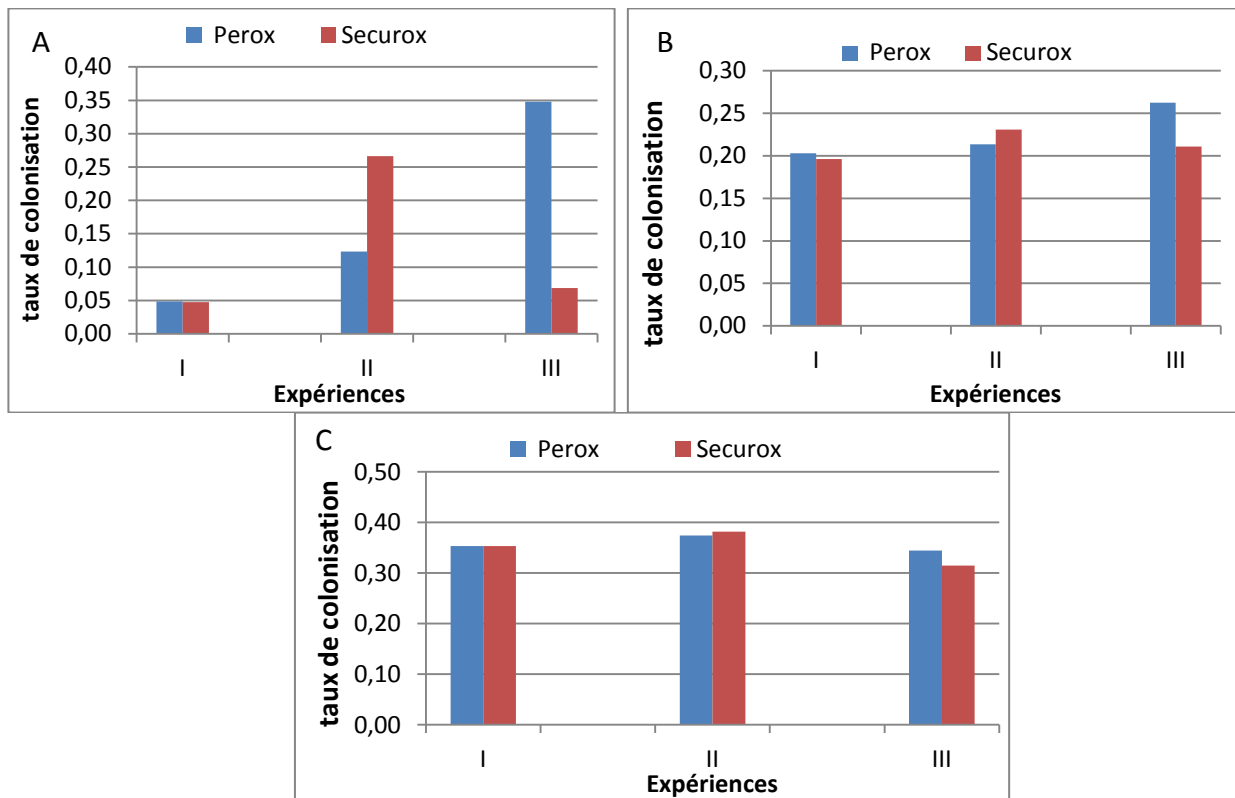


Figure 179 : Vitesses initiales de production d'ATP (A) et de colonisation des supports artificiels par les bactéries cultivables (B) et les bactéries totales (C) entre J0 et J14. Comparaison des traitements Securox et Perox

Ces résultats permettent de distinguer deux cas de figure spécifiques à chaque tour :

- 1- tour Securox : les taux de production d'ATP, les vitesses de colonisation initiales des bactéries cultivables et des bactéries totales augmentent entre l'expérience I et l'expérience II puis diminuent pour l'expérience III.
- 2- tour Perox : les taux de production d'ATP, les vitesses de colonisation initiales des bactéries cultivables augmentent progressivement jusqu'à l'expérience III. Cette

augmentation est plus marquée entre les expériences II et III en rapport avec la diminution de la performance de ce traitement. La vitesse de colonisation initiale des bactéries totales reste relativement stable tout au long de cette campagne.

Les vitesses de colonisation des bactéries (totales et cultivables) dans les deux tours restent très proches. Seul l'indicateur ATP subit des variations importantes : de l'expérience I à l'expérience III, son taux de production initial sur les lames augmente en permanence dans le cas de la "tour Perox", alors qu'il chute entre les deux dernières expériences dans le cas de la "tour Securox".

Ces remarques nous amènent au constat d'une disjonction entre l'information apportée par la concentration en ATP et celles apportées par les concentrations en bactéries totales et cultivables : la perturbation de la production d'ATP, par les biocides, affecte très probablement (en les abaissant) les taux de colonisation des bactéries cultivables et des bactéries totales, mais l'inertie de ces indicateurs est très différente et c'est la raison pour laquelle leurs valeurs apparaissent relativement constantes.

L'augmentation progressive des taux de colonisation des supports artificiels pourrait trouver une explication dans les "conditions générales du milieu" qui sont principalement déterminées par :

- la concentration des nutriments organiques ;
- la température ;
- la concentration des autres composés dissous et plus globalement, la salinité de l'eau ;
- la concentration des biocides ;
- la concentration des bactéries en suspension dans l'eau ;
- et l'état de contamination des tours.

L'eau d'appoint des tours est peu contaminée et les bactéries planctoniques de l'eau de refroidissement sont issues, pour la plupart, de l'érosion des biofilms qui colonisent les parois de l'installation. Leur concentration devrait donc être en relation avec la concentration des bactéries fixées.

C'est dans le but d'examiner cette relation que nous avons rapproché, dans la figure 180, la vitesse initiale de colonisation et la concentration bactérienne des supports en place. Pour cette dernière, seuls les résultats concernant les parois ont été retenus ici. Dans le détail, lors de cette campagne, les tours n'ont pas été nettoyées. La comparaison est faite ici entre l'état de colonisation de la tour à la fin de l'expérience « n » et le taux de colonisations des supports artificiels de l'expérience « n+1 ». En effet, l'échantillonnage des supports en place était effectué à la fin de chaque expérience et précédait donc la phase de colonisation initiale des supports artificiels de l'expérience suivante.

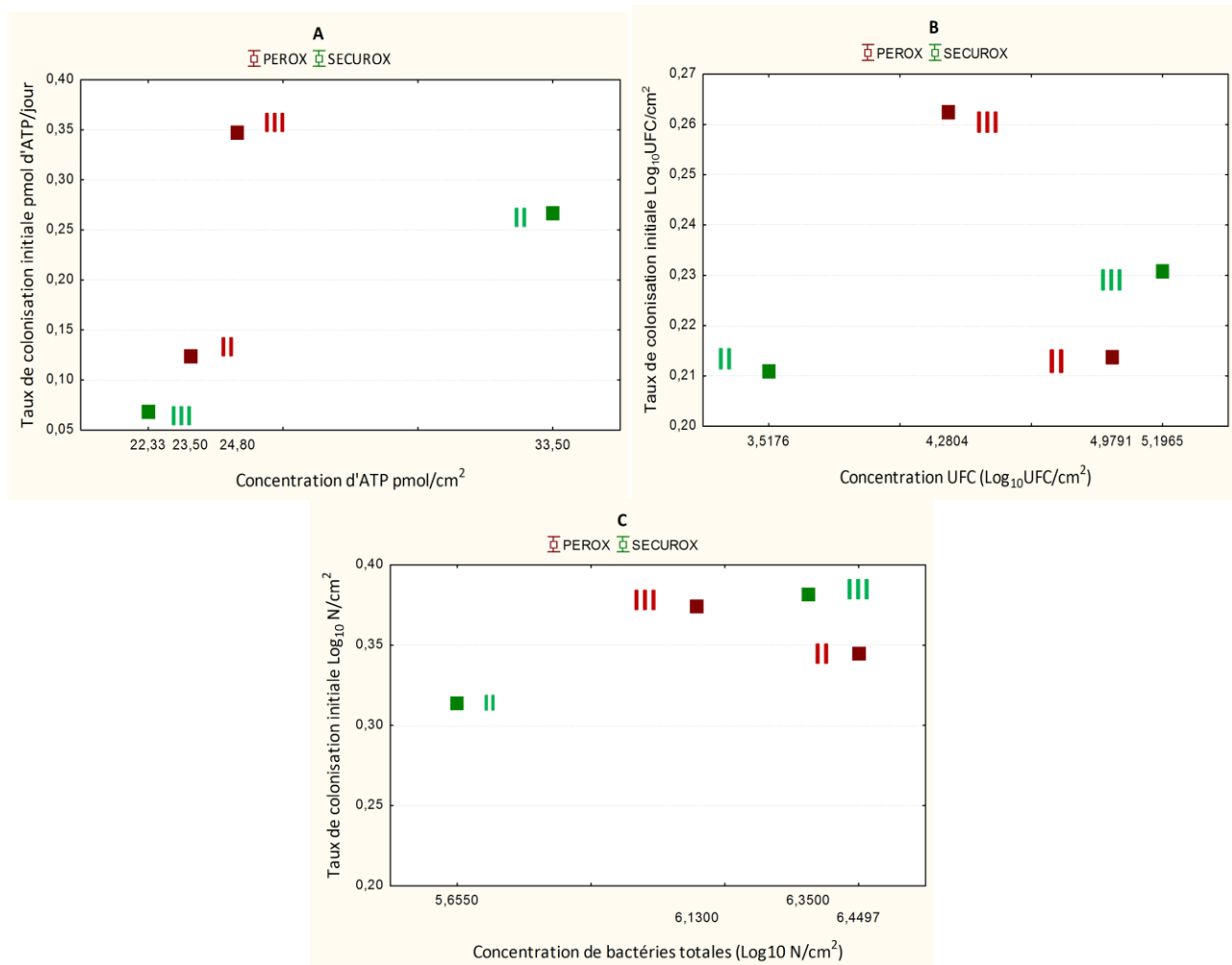


Figure 180 : Comparaison de l'état de contamination des tours à la fin de l'expérience n avec les vitesses initiales de colonisation des supports artificiels de l'expérience n+1. La comparaison porte sur l'ATP (A), les bactéries cultivables (B) et les bactéries totales (C). Seules les valeurs correspondantes aux biofilms des parois ont été considérées ici.

La figure 180, montre un effet dans le seul cas de la "tour Securox". Les pentes initiales des trois indicateurs sont effectivement plus grandes lorsque la concentration des bactéries des supports en place est plus grande. La sensibilité des indicateurs aux variations de la colonisation des supports en place est, par contre, très différente : celle de la production d'ATP s'oppose ici, à une inertie des cellules, ce qui est conforme à la nature de ces indicateurs, la réactivité d'une réaction biochimique étant évidemment plus grande que la "construction" d'une cellule.

Dans le cas de la "tour Perox", une relation identique est observée pour l'ATP et une relation exactement inverse est observée pour les bactéries. L'augmentation spectaculaire (191 %) du taux de production de l'ATP lors de l'expérience III ne peut pas s'expliquer par l'unique augmentation de la concentration de l'ATP dans les biofilms des parois, qui est très faible (augmentation de 5%). Elle pourrait se justifier par la baisse de performance du traitement Perox, précédemment mise en évidence. Nous pouvons expliquer la relation inverse entre les taux de colonisation et les concentrations des indicateurs par l'augmentation des taux de colonisations sous l'effet de la baisse de la performance du traitement Perox durant l'expérience III (baisse de la contrainte biocide). Ce résultat montre que la colonisation des supports artificiels, influencée en grande partie par le degré de colonisation du milieu, dépend également de la « contrainte biocide ». La baisse de la performance de l'H₂O₂/UV, serait liée à la baisse de la puissance des radiations UV et à l'adaptation

microbienne au stress oxydatif, qui aboutissent à une augmentation de la vitesse de colonisation des supports artificiels.

VII.2.3.5 Explication de la baisse de performance du procédé Perox

Afin de montrer un éventuel effet de la puissance des lampes UV et du flux d'H₂O₂ sur la performance du traitement Perox, les données ont été traitées par une analyse de variance (Anova) multifactorielle de 4 variables expliquées (indicateurs de biofilms) et deux variables explicatives avec *p-value*= 0,05 (flux H₂O₂ et puissance UV). Le résultat de cette analyse de variance est présenté dans le tableau 54.

Tableau 54 : Analyse de variance par Anova multifactorielle de 4 variables expliquées et 2 variables explicatives

p	ATP	Bactéries cultivables	Bactéries totales	% Bactéries cultivables
[H ₂ O ₂]	0,25	0,65	0,30	0,09
Puissance UV (W électrique)	0,00001	0,15	0,97	0,0008

L'ANOVA multifactorielle est un test statistique qui détermine si des facteurs qualitatifs (ici, la concentration de l'H₂O₂ et la puissance UV) ont des effets significatifs sur des variables dépendantes quantitatives (ici les indicateurs du biofilms). Elle montre que la variable explicative "puissance UV" explique uniquement l'augmentation des concentrations d'ATP et des pourcentages des bactéries cultivables (*p*<0,05) lors de l'expérience III. L'effet de la diminution des radiations UV passerait, entre autre, par la diminution des radicaux hydroxyles produits par la catalyse de l'H₂O₂ par les UV.

La diminution des performances de ce traitement, serait due en plus de la baisse des radiations UV, à l'adaptation des communautés microbiennes des biofilms au stress oxydatif. Ce phénomène a été observé lors des expériences pour lesquelles le traitement unique était l'H₂O₂. Dans les conditions des expériences de laboratoire, le couplage de l'H₂O₂ aux UV à 33W-électrique a permis de prévenir ce phénomène dans un volume totale de 100 L mais avec des concentrations de 50 et 30 ppm d'H₂O₂. La puissance UV employée lors des expériences en grandeur réelle (et les concentrations d'H₂O₂ appliquées) seraient donc sous dimensionnées pour un effet optimal et pour prévenir l'émergence de communautés microbiennes capables de s'adapter au stress oxydatif.

En conclusion

Avant de résumer, il faut rappeler que les concentrations résiduelles des biocides, seules témoins des concentrations "vues" par les bactéries et les flux des biocides ont été changées entre les 3 phases de la campagne.

En termes de concentration et dans les deux cas, le changement le plus important s'est produit entre les expériences I et II (-30 % pour H₂O₂, -36 % pour ClO₂). Ces changements se sont accompagnés de l'augmentation de 40% et de 60% des flux d'H₂O₂ et de ClO₂ respectivement. Par la suite, la concentration du ClO₂ est restée stable durant la 3^{ème} expérience avec tout de même une augmentation du flux de ClO₂ de 25%. La concentration de peroxyde, quand à elle, a encore été diminuée (de 12 %), simultanément à une diminution de moitié de l'irradiation UV et à une augmentation du flux d'H₂O₂ de 35%. La baisse de la concentration de ClO₂ entre l'expérience I et II et sa stabilisation lors de l'expérience III malgré l'augmentation progressive du flux s'explique essentiellement par la perte du ClO₂ par 'stripping'. L'augmentation des flux d'H₂O₂ et la baisse des radiations UV –consommatrice d'H₂O₂- devrait en toute logique aboutir à l'augmentation des

concentrations de H_2O_2 mais c'est le résultat contraire qui a été obtenu. La baisse de la concentration de H_2O_2 pourrait s'expliquer par une surconsommation de H_2O_2 . La source la plus probable de cette surconsommation serait l'augmentation de la proportion de bactéries adaptées au stress oxydatif.

L'interprétation des résultats doit également tenir compte du fait que les tours n'ont pas reçu les mêmes sollicitations en termes de puissance échangée.

Les principaux points relevés par l'analyse des résultats des substrats en place et des substrats artificiels sont les suivants :

- des différences significatives et systématiques sont apparues pour tous les indicateurs, entre le fond des tours et leurs parois. Les résultats des fonds, comme cela a été le cas lors des précédentes campagnes, sont souvent associés à des incertitudes très élevées, en rapport avec la sédimentation. L'échantillonnage des biofilms ne doit s'adresser qu'à un seul type de supports en place si des comparaisons doivent être faites entre deux dates ou entre deux traitements ;
- les valeurs des indicateurs ont été globalement plus élevées au cours de la 1^{ère} expérience qui a été pour partie, une phase d'ajustement des traitements. Il se peut, en outre, que les biocides n'aient pas eu leur plein effet sur les bactéries, durant cette période, en liaison avec un effet protecteur des biofilms et ce, en toute cohérence avec le délai d'action important du ClO_2 constaté au cours de la campagne 2010 ;
- la performance du procédé Perox a manifestement été inférieure à celle du procédé Securox durant cette campagne pour plusieurs raisons :
 - la difficulté à maintenir une concentration de H_2O_2 suffisamment forte, difficulté qui semble liée à une augmentation progressive du pourcentage de bactéries développant des moyens de défenses contre le stress oxydatif ;
 - l'abaissement (qui a été décidée en termes de test) de l'irradiation UV à $2.3 J.cm^{-2}$ (66 W) qui, dans la phase expérimentale du programme a semblé prévenir l'adaptation bactérienne au stress oxydatif, toutefois avec un volume d'eau de recirculation plus petit (100 L), des concentrations d' H_2O_2 plus élevées et un mode d'application des UV en boucle ;
- les résultats obtenus avec l'indicateur «bactéries totales" suggèrent une action de décapage des biofilms par le ClO_2 en addition de son effet sur le métabolisme des bactéries ;
- malgré leurs différences, les deux procédés semblent suffisamment performants pour éviter le développement de formes cultivables de *L. pneumophila*.

VII.2.3.6 Comparaison des charges bactériennes respectives de l'eau et des biofilms

Cette comparaison a été réalisée dans le but de compléter les raisonnements faits pour les campagnes précédentes à propos de la relation bactérie planctonique-bactéries fixés. Les biofilms considérés ici sont ceux recueillis sur les supports artificiels

La comparaison porte uniquement sur les concentrations d'ATP et de bactéries cultivables, les deux seuls indicateurs communs aux analyses faites sur les deux types d'échantillons (figure 181).

L'information principale recherchée dans cette comparaison est celle de la cohérence des résultats obtenus par l'analyse des deux milieux du point de vue de la performance des biocides.

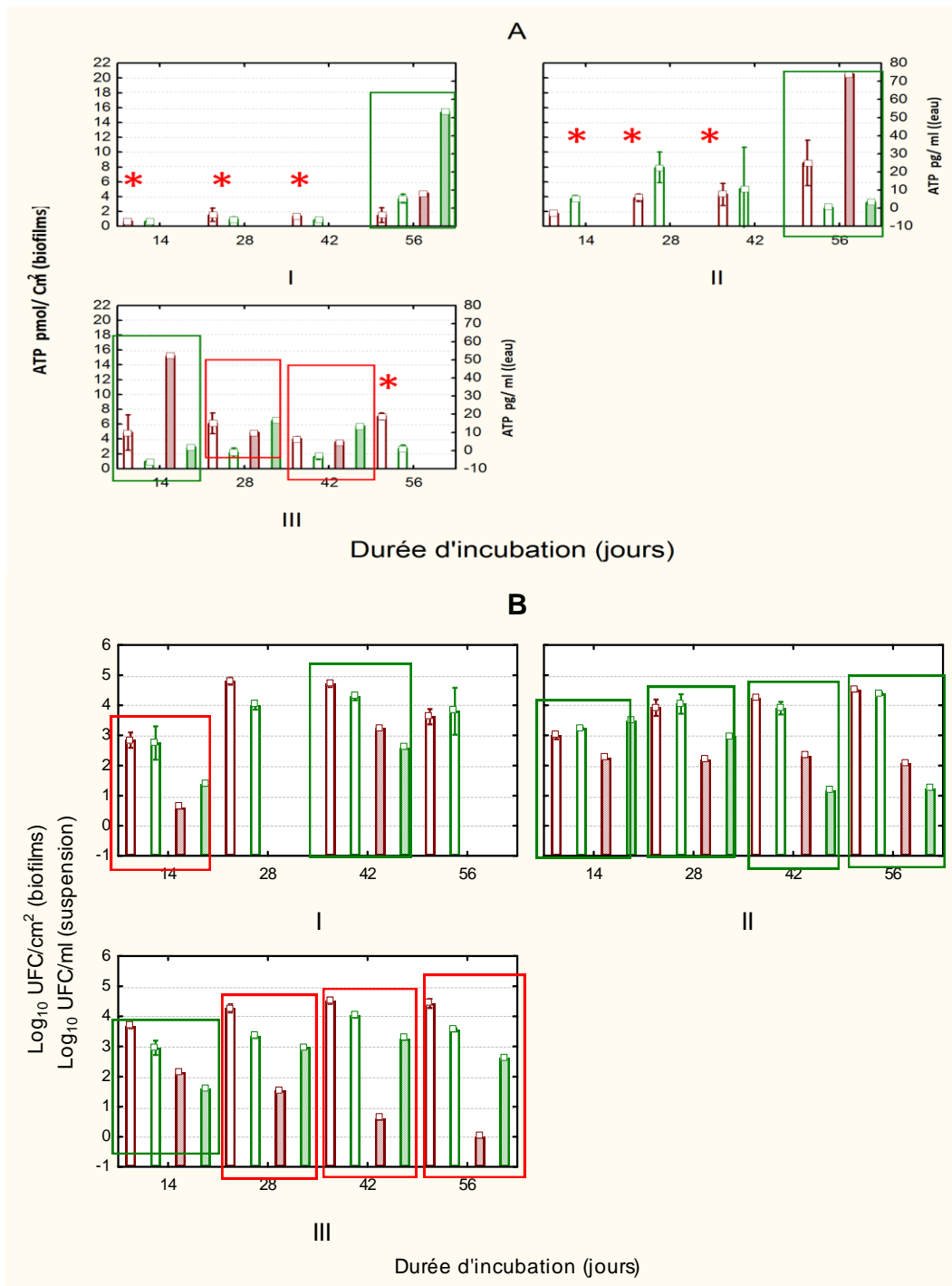


Figure 181 : Comparaison des charges bactériennes de l'eau (remplissage hachuré) et des biofilms (remplissage uniforme) du point de vue de la concentration en ATP (A) et de celle des bactéries cultivables (B) sous l'effet des traitements Perox (colonnes rouges) et Securox (colonnes vertes). Les étoiles marquent les dates pour lesquelles il n'y a pas de mesure disponible sur l'eau.

Cette comparaison montre que les conclusions apportées par l'analyse de l'eau sont partiellement contradictoires à celles obtenues par l'analyse du biofilms. L'analyse de l'ATP de l'eau a été effectuée ponctuellement et peu de valeurs sont disponibles. Concernant le classement des traitements en termes de performance, la cohérence entre biofilm et eau est respectée dans 3 cas sur 5 (cadres verts de la figure 181 A). Dans 2 cas, cependant, (expérience III, J28 et J42) les analyses des biofilms donnent la supériorité au traitement Securox alors que l'analyse de l'eau donne le résultat inverse.

Les résultats relatifs aux dénombrements des bactéries cultivables (figure 181 B) font, eux aussi, apparaître une incohérence entre les analyses de l'eau et celles des biofilms. Parmi les 10 comparaisons possibles, l'eau et les biofilms donnent un classement identique pour 6 des comparaisons possibles (cadres verts, Securox>Perox) et un classement inverse dans les autres cas (cadres rouges : dans le biofilms Securox>Perox et dans l'eau Perox>Securox).

Globalement donc, le constat est celui d'une cohérence dans certains cas et d'une incohérence dans d'autres cas entre les informations données par l'eau et par les biofilms. Les cas dans lesquels les résultats sont discordants posent évidemment problème sur le plan opérationnel, sachant que les contrôles ne sont effectués que sur l'eau.

Concernant plus précisément, l'appréciation de la performance des traitements, les cas de discordance, montrent que les analyses d'eau donnent alors systématiquement la supériorité au traitement Perox. Ce constat est en fait une autre approche des résultats à partir desquels l'hypothèse d'un effet du traitement Perox plus marqué que celui du traitement Securox, sur les bactéries planctoniques alors que le traitement Securox est plus performant sur les bactéries fixées. Ce constat est probablement en relation avec une meilleure accessibilité des radicaux OH^\bullet qui ont une durée de vie très courte aux bactéries planctoniques, et une meilleure diffusion du ClO_2 dans les biofilms, hypothèse qui reste néanmoins à confirmer.

La figure 182 apporte encore une confirmation des incohérences entre les résultats de l'analyse des biofilms et de l'analyse de l'eau. Elle représente les coefficients de variation (CV) associés aux moyennes et aux médianes, des concentrations des bactéries cultivables. Ces coefficients sont plus grands dans le cas des échantillons d'eau que dans celui des échantillons de biofilm (à une exception près). Le contraste est plus grand dans le cas des coefficients calculés à partir des médianes et des MAD et démontre une plus grande dispersion des mesures effectuées sur l'eau.

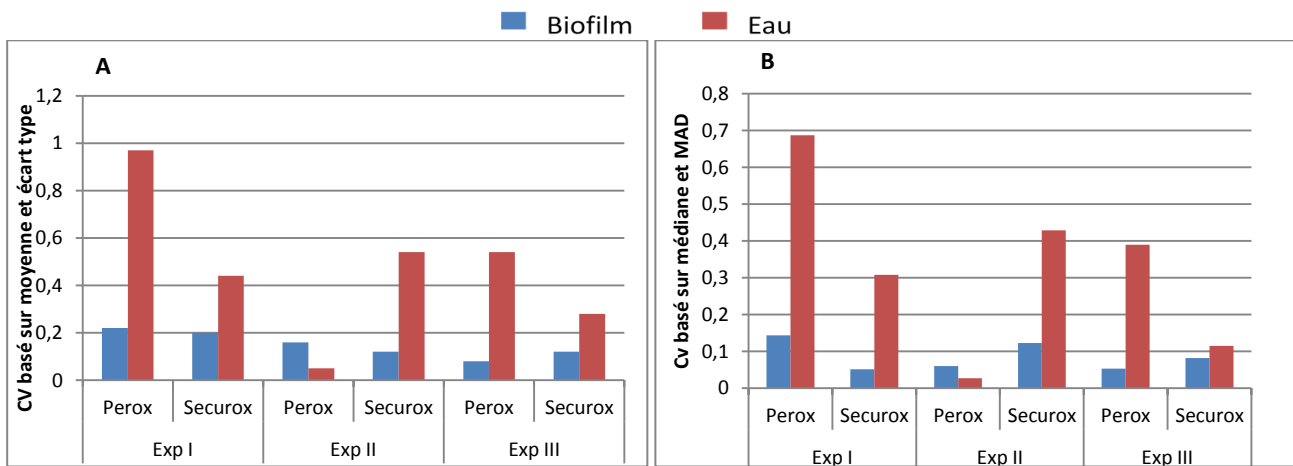


Figure 182 : Comparaison des coefficients de variations des concentrations des bactéries cultivables calculés à partir d'écart types et de moyennes d'une part (A), et à partir des MAD (median absolute deviation) et des médianes (B). Le jeu de données est celui des concentrations en bactéries cultivables de l'eau et des biofilms développés sur substrat artificiel durant la campagne 2011.

VII.2.3.7 Comparaison des niveaux de contamination des tours lors de la campagne de 2011 et la campagne de 2010

Durant la campagne de prélèvement 2011, nous ne disposions pas d'une référence permettant d'évaluer les performances des traitements ClO_2 et $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$. Nous avons donc comparé les résultats de ces deux traitements aux résultats du traitement de références DBNPA/Isiothiazolone de la campagne de 2010. Les valeurs utilisées ici sont celles des biofilms des supports artificiels (lames de verre) au moment de leur développement maximal (ce qui ne signifie pas dans tous les cas que les concentrations soient maximales) c'est-à-dire au dernier jour de chacun des 3 expériences et les valeurs obtenues à partir des supports en place, échantillonnés le même jour (tableau 55). La comparaison des traitements pour chaque indicateurs montre qu'en ce qui concerne les bactéries totales et les bactéries cultivables, les ordres de grandeur restent les mêmes quel que soit le traitement. Du point de vue de l'ATP, caractérisé par une inertie très faible, quelques différences ont été observées notamment lors de l'expérience III de la campagne de 2011, pour laquelle les concentrations d'ATP sont plus élevées que celle obtenues en 2010.

En conclusion l'application des traitements biocide ClO_2 et $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, aboutissent à des performances plus au moins similaires à celle du couple DBNPA/Isiothiazolone et permettent de maintenir des niveaux de contamination des tours comparables à ceux de la campagne de 2010.

Tableau 55 : Comparaisons des résultats d'analyse des biofilms des supports en place et des supports artificiels lors des campagnes de prélèvements de 2010 et de 2011

Nature substrat	Expériences	ATP pmol/cm ² (*)			UFC (Log ₁₀ /cm ²) (*)			Bactéries totales (Log ₁₀ /cm ²) (*)			Amibes/cm ² (*)		
		Perox	Securox	DBNPA/ISO **	Perox	Securox	DBNPA/ISO **	Perox	Securox	DBNPA/ISO **	Perox	Securox	DBNPA/ISO **
naturels	I	20,66 (5,76)	25,89 (9,68)	/	4,86 (0,18)	5,01 (0,3)	/	6,17 (0,2)	6,36 (0,14)		56 (16)	90 (53)	/
artificiels	I	1,51 (1,01)	3,75 (0,62)	1,39	3,62 (0,26)	3,80 (0,8)	3,72	5,76 (0,11)	5,67 (0,05)	5,04	70 (12)	28 (9)	ND
naturels	II	15,62 (7,72)	11,03 (3,26)	5	4,30 (0,13)	3,74 (0,3)	6,41	6,37 (0,19)	5,73 (0,1)	7,82	80 (18)	71 (15)	450
artificiels	II	8,57 (3,06)	2,52 (2,14)	12,13	4,50 (0,04)	4,38 (0,05)	5,16	5,63 (0,1)	5,42 (0,05)	6,6	45 (19)	17 (8)	217
naturels	III	25,95 (6,43)	10,49 (4,14)	1,50	5,37 (0,13)	4,36 (0,11)	4,66	6,44 (0,2)	5,58 (0,16)	6,41	ind	ind	249
artificiels	III	7,05 (0,43)	2,71 (2,44)	0,2	4,43 (0,15)	3,55 (0,05)	3,76	5,81 (0,1)	4,80 (0,06)	5,47	ind	ind	138

(*) Ecart types, **Concentrations maximales, Ind : indétectable

VII.2.4 Discussion

L'étude des procédés de traitement des tours aéroréfrigérantes par le ClO_2 et $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ est indispensable pour la mise au point de ces procédés pour des applications à des installations en grandeur réelle. Cette étude a permis de mettre en application les résultats obtenus à la suite d'expériences en laboratoire.

Informations relatives à la performance des traitements et à leurs modes d'action

La comparaison des résultats du traitement Securox à 0,1 ppm et à 0,05 ppm et la confrontation du traitement Securox au couple DBNPA / isothiazolone, lors de la campagne 2009, a mis en évidence une baisse de performance de ce traitement à 0,05 ppm. Ce constat montre que le ClO_2 semble trouver sa limite autour d'une concentration, dans le bassin froid, de 0,05 ppm. Durant la campagne de 2010, l'association du ClO_2 avec l'isothiazolone s'est révélée plus performante que le couple DBNPA/Isouthiazolone, bien que cela n'ait pas été systématique. De même, la campagne de 2011 montre des performances globalement plus grandes du traitement Securox que celles du traitement Perox. Toutefois les écarts sont faibles. L'un des essais de cette campagne a été conduit avec une faible irradiation UV, qui a clairement été liée à la baisse de sa performance. Il semble en outre, que les concentrations d' H_2O_2 appliquées n'ont jamais empêché le développement de mécanismes d'adaptation des populations bactériennes au traitement, et donc que la proportion de bactéries développant une résistance aux stress oxydatifs ait augmenté au cours des expériences. Les radiations UV appliquées semblent insuffisantes pour prévenir ce phénomène comme cela avait pu être le cas dans les essais expérimentaux du procédé Perox.

Ces deux constats nous orientent vers l'hypothèse d'une adaptation microbienne vis-à-vis du stress oxydatif généré par H_2O_2 , cette adaptation a été confirmée par ailleurs par d'autres analyses réalisées au LCME (laboratoire partenaire du projet Legiosecure, résultats non présentés). En effet il a été montré que la cinétique de dégradation de H_2O_2 dans une eau provenant de la tour traitée à $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ était plus rapide que dans une eau de robinet ou en provenance de la tour traitée au ClO_2 .

Nous avons montré préalablement que ce phénomène d'adaptation apparaissait uniquement dans le cas de traitement à H_2O_2 seul et le couple H_2O_2 (10 ppm)/UV et que le couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 permettrait de prévenir ce phénomène. Dans cet expérience, malgré la présence de radiation UV, ce phénomène d'adaptation a eu lieu suggérant que le niveau des radiations appliqués était sous dimensionné pour les TARs étudiées et qu'en conséquence, il ne permettait pas de prévenir ce phénomène. Ceci pourrait être attribué à la vitesse de production des radicaux OH^\bullet qui résulte du couple puissance UV/flux H_2O_2 . Il est donc nécessaire d'appliquer ce traitement à des puissances UV et à un flux d' H_2O_2 suffisamment élevés pour permettre de produire suffisamment de radicaux hydroxyles. Ce paramètre doit ainsi être adapté à chaque site.

Dans le cas des deux traitements, aucun développement significatif de formes cultivables de *L. pneumophila* n'a été détectée. De plus, les concentrations de *L. pneumophila* totales, quand la détection a été possible, se sont avérées très faibles.

En absence d'une référence lors de la campagne de 2011, les performances des deux traitements ont été comparées à celle du traitement d'origine appliqué durant la campagne de 2010. Cette comparaison montre que leurs performances sont apparues au moins équivalentes à

celle du traitement d'origine (couple DBNPA / isothiazolone). C'est donc en termes de coûts des produits et de la main d'œuvre de gestion et de maintenance, ainsi qu'en termes de rejets dans l'environnement que leurs différences devraient être appréciées.

Comme lors de la campagne de 2010, plusieurs résultats obtenus lors de la campagne 2011 convergent vers l'indication d'une éradication lente (à l'échelle de plusieurs mois) des biofilms sous l'effet du ClO_2 , tout au moins dans le contexte des expériences qui ont été menées. Tout se passe comme si la contrainte biocide s'imposait progressivement au sein des biofilms.

Plusieurs résultats suggèrent également un effet plus marqué du traitement Perox sur les bactéries en suspension et du traitement Securox sur les bactéries fixées. Cet effet pourrait être expliqué dans le cas du traitement Perox par l'action spécifique du couple H_2O_2 -UV sur le carbone organique dissous mais également par une durée de vie très courte des radicaux hydroxyles minimisant ainsi leur accès au biofilms. En ce qui concerne le Securox, ce résultat pourrait s'expliquer par une meilleure diffusion dans les biofilms, constat qui reste néanmoins à l'état d'hypothèse. Cependant l'action significative du traitement Securox sur les biofilms engendre peut être un relargage important de microorganismes dans l'eau ce qui a masqué l'effet biocide du ClO_2 dans l'eau, d'où sont apparente faible efficacité sur les communautés bactériennes de l'eau comparé au traitement Perox.

Informations relatives aux techniques d'échantillonnage des biofilms

Lors de cette étude, deux modalités d'échantillonnages ont été employées pour le prélèvement des biofilms. La première consiste à prélever les biofilms directement à partir des parois et des fonds des tours par grattage et la deuxième consiste à déposer et à laisser incuber des substrats artificiels qui supportent le développement des biofilms. Sur l'ensemble des 3 campagnes les conclusions en termes de performance des biocides montrent que les résultats obtenus à partir des deux types de support, sont comparables.

Néanmoins les biofilms prélevés sur les parois sont plus concentrés en microorganismes. Ainsi en termes de concentration de microorganismes, les biofilms développés sur substrats artificiels sous estiment l'état de contamination réel des parois des tours par les biofilms. Cette différence pourrait être attribuée aux durées d'incubation, à la différence de la maturation des biofilms et à la nature des supports. Il semble que la durée de 56 jours sur des supports en lames de verre, ne permette pas d'atteindre l'état de maturité en présence de biocides. Certains auteurs démontrent pourtant que la durée de 15 jours suffit à la maturation des biofilms dans un contexte environnementale (Hunt *et al.*, 1998 ; Lear *et al.*, 2008).

Compte tenu des difficultés pratiques que pose l'échantillonnage des supports en place dans le contexte de tours aéro-réfrigérantes, la technique d'échantillonnage par des substrats artificiels présente un réel intérêt que nous avons validé lors de nos expériences. Une amélioration notable doit cependant être envisagée avec la modification de la nature des supports artificiels vers des matériaux plus proches de ceux du substrat en place. Plusieurs auteurs ont en effet montré l'influence de la nature des matériaux des supports artificiels sur les concentrations et la diversité des microorganismes dans les biofilms (Rodgers *et al.*, 1994 ; Hunt et parry, 1998 ; Hoellein *et al.*, 2010 ; Witt *et al.*, 2011).

Par ailleurs, les indications apportées par l'échantillonnage du plancher des tours pour l'évaluation de l'état des biofilms en place, ne sont pas complètement superposables à celles apportées par les parois. Elles sont plus bruitées sur le plan statistique du fait d'une plus grande hétérogénéité, due, en partie, à la présence de dépôts sédimentaires. Si la technique

d'échantillonnage par substrats artificiels devait connaître un développement, le choix devrait donc se porter de préférence sur l'échantillonnage des parois.

Le rapprochement des vitesses initiales de colonisation et des niveaux de contamination des supports en place des tours apportent la démonstration, dans le cas de la tour Securox (dans le cas de l'ATP en particulier) d'une étroite relation entre ces deux paramètres. Ce résultat montre que, dans un contexte comme celui des tours du CG38 où l'eau d'appoint est peu chargée en bactéries, les substrats artificiels apportent une information indirecte sur le degré de colonisation des tours. La transmission de cette information se fait par le biais de la concentration des bactéries planctoniques. Elle est probablement favorisée par l'effet de concentration inhérent au fonctionnement des tours aéro-réfrigérantes. Dans ce sens, les vitesses initiales de colonisation, sont également des indicateurs effectifs de la pression de colonisation des supports, et d'un intérêt évident pour l'évaluation de l'efficacité des traitements et l'appréhension des processus de reviviscence.

Informations relatives au choix du milieu analysé (eau / biofilms)

Une certaine cohérence a généralement été observée entre les informations apportées par les analyses de l'eau et par celles des biofilms, en termes de performance des traitements. L'analyse de l'eau, apporte en effet, des informations instantanées de l'état de contamination des tours. Cet état de contamination apprécié par l'analyse de l'eau est caractérisé par une inertie très faible du fait de l'influence de l'état de contamination de l'eau d'appoint et des supports en place des tours. La charge microbienne des supports en place permettent en effet une meilleure appréciation de l'état de contamination générale des tours du fait de leur inertie.

L'existence de quelques cas de discordance entre ces analyses, rappelle la nécessité d'éviter l'interprétation de mesures isolées et de privilégier l'acquisition d'un grand nombre de données distribuées dans le temps.

Informations relatives à la pertinence des indicateurs des populations microbiennes

Les expériences réalisées confirment l'intérêt d'indicateurs d'une activité métabolique des bactéries (concentration en ATP et cultivabilité des bactéries), pour leur réactivité vis-à-vis de l'effet des biocides et par contraste avec les indicateurs de plus grande inertie, tel que la simple présence des cellules bactériennes (concentration des "bactéries totales").

Sur l'ensemble des campagnes, l'indicateur "*L. pneumophila* cultivables" n'a jamais été discriminant vis-à-vis des traitements et de leurs variantes. Lors de la confrontation du traitement Securox avec le couple DBNPA / isothiazolone, dans le cadre de la campagne 2009, le Securox s'est avéré plus performant, mais sur la base de l'indicateur "*L. pneumophila* totales". Ce résultat montre que la prise en compte de cet indicateur permet de suivre de façon plus fine et à titre préventif, l'évolution des populations de *L. pneumophila* en amont de l'apparition de formes cultivables. Il présente donc un intérêt dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements ou de leur adaptation à des contextes particuliers. Sa mise en œuvre reste cependant très technique et non automatisée, ce qui fait qu'il ne peut pas être envisagé, pour l'instant, de le faire entrer dans un protocole opérationnel de routine.

D'après les résultats obtenus lors de nos différentes campagnes d'expériences, il est apparu un paramètre crucial dans l'installation et le développement des biofilms : la température au sein des tours aéro-réfrigérantes. Une évaluation des variations de température est possible par la mesure

de celle du bassin froid qui reflète l'activité de la tour. Ainsi, la colonisation des tours s'est révélée clairement beaucoup plus importante dès que la température des bassins s'élevait. Ainsi, le traitement biocides à utiliser, et les concentrations à appliquer, pourront différer au cours du temps en fonction des paramètres d'activité de la tour et des conditions climatiques. Par exemple, il serait possible d'envisager des doses de biocides à appliquer dans le traitement des TARs plus ou moins fortes selon la température relevée dans le bassin froid. Ceci permettrait de limiter le traitement lorsque les risques sont faibles et les adapter au mieux si les risques de colonisation augmentent.

VIII- Conclusion générale et perspectives

VIII | Chapitre VIII : Conclusion Générale et perspectives

VIII.1 Conclusion

Selon l'InVS, 1170 cas de légionellose ont été déclarés en France en 2011 et le taux d'incidence de la légionellose en France métropolitaine était de 1,8 pour 100 000 avec une mortalité de 10,8% (114 décès). Le nombre de cas a diminué de 24% par rapport à l'année 2010 (1540, incidence de 2,38 pour 100 000) et de 3% par rapport à l'année 2009 (1206 cas, incidence de 1,9 pour 100 000). En 2011, aucune épidémie (plus de 10 cas) suggérant une source commune de la contamination n'a été mise en évidence. Les investigations environnementales et microbiologiques réalisées ont permis de comparer dans 44 cas, la souche humaine aux souches environnementales isolées d'un lieu fréquenté par le malade, et pour 23 cas, les profils génomiques se sont révélés identiques. Ceci a permis de préciser l'implication formelle des réseaux d'eau sanitaires comme probable source de contamination pour 5 hôpitaux, 5 domiciles, 5 établissements de tourisme et 8 autres établissements. Pour ces 44 cas, aucune similitude entre les profils génomiques des souches humaines et des souches provenant de circuits de refroidissement de tours aëroréfrigérantes (TARs) n'a été démontrée (Source : InVS, 2011).

Malgré ces données statistiques, l'implication des TARs ouvertes dans les cas de légionellose n'est pas pour autant écartée et demeure encore un problème de santé public. Il faut garder en mémoire par exemple l'épidémie de Lens (Nguyen *et al.*, 2006). Face à cette problématique, les industriels et les fabricants ont parfois recours à des TARs fermées où le risque « légionnelle » est quasiment nul ce qui explique la recrudescence de ce type de TAR dans le parc national. La société COFFELY, un opérateur privé de traitement de l'eau notamment pour les TARs, estimait, dans une enquête sur son parc de tours humides en 2007, à 25% le nombre de tours amenées à disparaître du fait d'un remplacement par des tours fermées, malgré leur performance inférieure par rapport aux TARs humides et le fait qu'elles sont à la fois très consommatrices d'énergie électrique et relativement bruyantes.

Face à l'accroissement de la pression environnementale lié à l'utilisation de ces installations, mais aussi à l'utilisation des biocides écotoxiques, il est nécessaire d'étudier de nouvelles solutions de traitement moins nocives. Dans cette perspective, le projet R&D collaboratif Légiosecure a été initié pour étudier l'efficacité de deux procédés de traitement : le Securox (ClO₂) et le Perox (H₂O₂/UV). Une approche originale a été employée pour l'étude de l'efficacité de ces traitements, puisqu'elle a été réalisée sur des biofilms, qui constituent le principal habitat des microorganismes. Il est bien établi maintenant que les biofilms représentent un véritable obstacle vis-à-vis de l'action des biocides (Lewis 2005).

L'étude expérimentale du procédé Perox vis-à-vis des biofilms a conduit aux résultats suivants :

- l'inefficacité des UV seuls pour le traitement des biofilms malgré un effet significatif sur les bactéries planctoniques. Ce procédé a parfois, au contraire, été associé à un effet stimulateur en rapport avec l'oxydation partielle de la matière organique ;
- l'H₂O₂ seul a montré une performance transitoire, observée au cours des premières heures de traitement, Une reviviscence associée à une surconsommation d'H₂O₂ a été observée après 3 à 4 jours d'application (selon la concentration d'H₂O₂ appliquée). Cette reviviscence est expliquée par l'adaptation des communautés microbiennes à l'H₂O₂,

notamment, et par la sélection au sein du biofilm de bactéries possédant l'activité catalase ;

- seul le couple H₂O₂/UV a été efficace vis-à-vis de tous les indicateurs analysés aux concentrations de 30 et 50 ppm d'H₂O₂. Aucune adaptation au stress oxydatif n'a été observée lors des couplages à ces concentrations. Une attention particulière doit cependant être accordée à la valeur des flux appliqués.

L'architecture de notre pilote expérimental dans lequel les biofilms ne sont pas directement exposés aux UV et la durée de vie courte des radicaux OH[•] générés par la catalyse de l'H₂O₂ ne permettent pas d'attribuer la performance élevée du couplage uniquement à son effet biocide direct.

En parallèle, de l'étude de l'efficacité de ce procédé vis-à-vis des biofilms, des mesures de concentrations de COD et du COT ont été effectuées montrant que seul le couplage H₂O₂/UV permet de réduire significativement leurs concentrations. Ce résultat nous a orientés vers l'hypothèse d'une action indirecte par privation nutritionnelle dans nos conditions expérimentales (en plus de son action directe). Plusieurs études ont par ailleurs démontré les capacités de ce procédé pour l'oxydation avancée de la matière organique (Sarathy *et al.*, 2006 ; 2007 ; 2009 ; 2010).

Afin d'argumenter cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de traitement de solutions de matières organiques (en absence de biofilms) aux UV, à l'H₂O₂ et au couple H₂O₂/UV. Les principaux résultats sont les suivants :

- seul le couple H₂O₂/UV permet de réduire significativement les concentrations des différentes fractions du carbone organique. De plus, ce traitement permet de modifier complètement le profil moléculaire des solutions traitées, confirmant ainsi ses capacités d'oxydation avancée de la matière organique ;
- les UV permettent de modifier partiellement les profils moléculaires des solutions de matières organiques, signe d'une oxydation incomplète (aux doses d'UV délivrées et aux durées d'application testées). Cette oxydation incomplète, rendrait les molécules organiques plus accessibles aux microorganismes ce qui expliquerait l'effet stimulateur des UV ponctuellement observé sur les biofilms.

Ces résultats expérimentaux sont en concordance avec d'autres travaux notamment ceux de Sarathy *et al.* (2006 ; 2007 ; 2009 et 2010) et confirment l'effet de ce procédé par privation nutritionnelle. L'hypothèse d'une production de molécules toxiques à partir des acides humiques sous l'effet des traitements pourrait également expliquer cette performance. Cette hypothèse a été étudiée par des tests de toxicité vis-à-vis de *Vibrio fisheri* qui a été exposée à des solutions de matière organique traitées. Ces tests n'ont pas fait la démonstration d'un effet toxique de ces solutions. Ce résultat n'exclut pas pour autant cette hypothèse. En effet, la durée de traitement des solutions de matières organiques n'a été que de 6 h, donc plus faible que les durées appliquées lors des traitements des biofilms. Les concentrations des molécules toxiques qui seraient produites pendant 6 h d'application pourraient être insuffisantes pour avoir un effet toxique. Nous suggérons donc de refaire ces tests en augmentant la durée d'application des traitements et/ou en concentrant par évaporation les solutions de matières organiques traitées.

Nous n'avons pas étudié les mécanismes exacts et les conséquences détaillées de la privation nutritionnelle sur les biofilms : est-ce qu'elle agit en provoquant la lyse cellulaire ou le détachement du biofilm ? Certaines études apportent des éléments de réponse à cette question en montrant que la privation nutritionnelle serait un déclencheur potentiel du détachement du biofilm de *P. aeruginosa* (Hunt *et al.*, 2004). Les résultats de cette étude montrent (1) que la croissance des

biofilms dans des conditions de flux continu s'arrête après l'arrêt de ce flux, (2) que des cellules lysées apparaissent dans les couches internes du biofilm et (3) que des amas de biofilm se détachent des surfaces.

Delaquis *et al.* (1989) avaient préalablement étudié l'effet d'un appauvrissement en glucose ou en azote sur des biofilms de *P. fluorescens* cultivés dans des conditions de flux fermé (culture en batch). Cette privation conduit également aux détachements des cellules du biofilm vers la phase aqueuse, cellules à la recherche de conditions plus favorables pour leur croissance. Un phénomène inverse a été observé par Sauer *et al.* (2004). Ils ont en effet montré que la dispersion des *P. aeruginosa* PAO1 des biofilms est induite par une augmentation soudaine de la disponibilité d'une source de carbone. Ces deux résultats montrent alors que le détachement des cellules à partir des biofilms pourrait être induit dans un cas, par une privation nutritionnelle, et dans l'autre cas, par une disponibilité nutritionnelle excessive. En effet, une bactérie incluse dans un biofilm pourrait se détacher de ce dernier :

- dans le premier cas, pour échapper à la privation nutritionnelle constatée dans le biofilm et chercher des conditions plus favorables dans la phase aqueuse ;
- dans le deuxième cas, en réponse à des signaux indiquant une disponibilité nutritionnelle dans cette phase aqueuse (chimiotactisme).

Ainsi les mouvements cellulaires induits par les conditions nutritionnelles (sorte de chimiotactisme) se traduisent par l'expression de gènes impliqués dans la mobilité cellulaire. *P. aeruginosa* PAO1 réagit à une disponibilité nutritionnelle soudaine par une surexpression du gène *fliC* qui code pour des flagelles et la diminution de l'expression du gène *pilA* qui code pour des pilis (Sauer *et al.*, 2004).

Dans les conditions de nos essais, ce détachement rendrait les cellules bactériennes plus sensibles à l'action des traitements parce que plus exposées aux UV mais aussi aux radicaux hydroxyles. La durée de vie des radicaux OH^\bullet , sensiblement courte, ne serait donc plus un facteur limitant de l'action de ce procédé.

D'après les résultats des études du procédé Perox sur les biofilms et sur la matière organique (en présence et en absence de biofilm) nous pouvons donc conclure que ce procédé combine deux effets simultanés :

- **un effet direct induit par les radiations UV et la formation accélérée de radicaux OH^\bullet (par la catalyse de H_2O_2 sous l'effet des radiations UV). Dans les conditions de notre expérimentation les radiations UV ont un effet significatif sur la phase aqueuse et pas d'effet sur les biofilms (parfois un effet stimulateur). L'effet des radicaux hydroxyles extrêmement réactifs et d'une durée de vie très courte, est très élevé sur la phase aqueuse mais limité sur les biofilms du fait de l'éloignement des biofilms par rapport à la source de production de ces radicaux ;**
- **un effet indirect par la privation nutritionnelle qui agit à son tour sur la mortalité des cellules, mais aussi sur le détachement des cellules et de fragments de biofilms qui deviennent par la suite plus accessibles à l'effet direct du procédé de traitement ;**
- **à ces effets s'ajouterait un amincissement de l'épaisseur des biofilms suite au détachement des cellules (ou de fragments de biofilms), ce qui se traduirait par une meilleure diffusion du biocide à travers les différentes strates du biofilm.**

Nous pouvons ajouter ici, un troisième mode d'action par la genèse, sous l'effet du traitement, de molécules toxiques secondaires plus stables et qui pourraient donc diffuser dans le milieu et agir sur des cibles éloignées. Certes, cette hypothèse n'a pas pu être

confirmée ni écartée par nos essais de toxicité, mais elle a été rapportée dans la bibliographie notamment en ce qui concerne les aldéhydes (Cabiscol *et al.*, 2000).

Le phénomène d'adaptation n'a pas été mis en évidence sous l'effet du couplage lors des expériences à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 couplé aux UV, mais cela ne signifie pas qu'il ne peut pas subvenir. Il serait intéressant de poursuivre ces expériences pour éclairer ce point (voir perspectives).

La prévention de la reviviscence qui est due à l'adaptation au stress oxydatif lors du couplage pourrait être le résultat :

- du flux élevé d' H_2O_2 appliqué dès le début du traitement lors du couplage, nécessaire pour le maintien des concentrations d' H_2O_2 . Ce flux a été d'environ 250 mg/h lors du couplage et <50 mg/h lors des traitements à l' H_2O_2 seul (avant l'apparition de l'adaptation). Les bactéries ont donc été exposées, lors du couplage, à des doses très élevées d' H_2O_2 et de radicaux OH^\bullet qui seraient létales, ce même pour les bactéries possédant l'activité catalase. L'apparition de ce phénomène lors du traitement à l' H_2O_2 seul s'est traduite par l'augmentation du flux d' H_2O_2 à des niveaux similaires à ceux du couplage, mais la reviviscence n'a pas pu être maîtrisée, probablement du fait que l'application d'un faible flux d' H_2O_2 (non léthal) durant les premières heures de traitement a permis aux bactéries résiduelles de s'adapter au stress oxydatif;
- l'action non spécifique du couplage sur les concentrations et la biodégradabilité de la matière organique. Cette action impacte l'ensemble des communautés microbiennes, qu'elles possèdent ou non l'activité catalase. En effet seul le couplage a permis de réduire significativement les concentrations des différentes fractions du carbone organique (dont le CODB) que ce soit en présence ou en l'absence de biofilm. De cette privation nutritionnelle résulte une mortalité cellulaire, le détachement des cellules et une meilleure diffusion dans le biofilm de l' H_2O_2 disponible.

Malgré cette performance élevée, ce traitement n'a pas été germicide à 100% et une fraction bactérienne survit à son effet. Cette fraction cellulaire pourrait correspondre à ce qu'on appelle dans la bibliographie « les Persisters » (Keren *et al.*, 2004). Cette fraction survit aux traitements biocides par plusieurs mécanismes. Dès que les conditions de traitement le permettent les microorganismes peuvent croître de nouveau et constituent alors un risque microbiologique.

Cette reviviscence est principalement limitée par la disponibilité nutritionnelle. Le traitement H_2O_2 /UV serait donc un frein à cette reviviscence du fait de son effet sur la matière organique.

Nos résultats ont été obtenus dans des conditions de laboratoire particulières. L'application des traitements à des sites en vraie grandeur nécessite évidemment une adaptation des concentrations de l' H_2O_2 et des radiations UV aux caractéristiques particulières des TARs notamment du point de vue :

- des charges microbiologiques des biofilms ;
- de la concentration de la matière organique de l'eau de refroidissement, notamment pour privilégier son oxydation complète.

L'étude expérimentale du procédé Securox a été réalisée selon la même démarche expérimentale que celle mise en œuvre pour le procédé Perox. Le rôle trophique sur la décroissance des biofilms a également été mis en évidence lors de ces expériences. En absence d'un apport nutritif constant, les charges microbiologiques des biofilms de référence (non traités)

décroissent après un certain temps d'incubation. Pour les biofilms traités, nous avons plutôt mis en évidence un phénomène d'épargne nutritionnelle qui se produit en cascade :

- un traitement biocide efficace induit une diminution des charges microbiologiques et donc une diminution de la consommation des nutriments ;
- le pool de nutriments disponibles favorise ainsi la reviviscence dès l'arrêt des traitements d'où la reviviscence ;
- dans le cas des traitements agissant sur les concentrations de matières organiques, cette relation serait rompue du fait de l'indisponibilité nutritionnelle sous l'effet de ce traitement.

On constate donc une étroite relation entre l'efficacité des traitements, l'épargne des nutriments et la reviviscence, relation qui ne serait vraie que pour les traitements n'ayant pas d'effet sur les concentrations de matières organiques.

Swietlik et *al.*, (2004) ont montré que l'oxydation de la matière organique par le ClO_2 appliqué à de fortes doses (1,2 mg ClO_2 / mg COD, 24 h) n'est pas complète et aboutit à la formation de molécules organique biodégradables. Un résiduel de ClO_2 suffisamment élevé est donc nécessaire pour prévenir cette reviviscence également due à la fraction résistante des communautés microbienne (Persisters). Néanmoins, il faut veiller à ce que le résiduel appliqué ne soit pas inducteur du phénomène de corrosion. Nous n'avons pas étudié les effets du ClO_2 aux concentrations que nous avons testées, vis-à-vis de la matière organique. Ce facteur devra être pris en compte dans de futures expérimentations.

Les principaux résultats de cette étude montrent qu'à forte dose (0, 1 ppm et 50 mg/j) l'injection continue aboutit à une meilleure performance alors qu'à faible dose (0,05 et 25 mg/j), c'est plutôt l'injection discontinue qui aboutit à un meilleur résultat. C'est par l'injection discontinue que nous avons pu montrer une économie de produit de 50 % avec la prolongation de la durée d'application. L'injection discontinue de 25 mg/j a permis en effet d'aboutir aux mêmes performances que celles obtenues par l'injection discontinue de 50 mg/j et permet de réduire l'amplitude de la reviviscence. Ce constat n'a pas été obtenu avec l'injection continue.

Sur le plan opérationnel, l'étude en grandeur réelle a permis de confirmer certains résultats obtenus à l'échelle expérimentale, notamment en ce qui concerne le seuil d'efficacité du ClO_2 déterminée à une concentration de 0,05 ppm. En appliquant ce traitement avec une modalité d'injection continue, c'est la concentration de 0,1 ppm qui semble la plus appropriée et qui permet d'obtenir une performance supérieure à celle des traitements de référence (DBNPA/Isotiazolone). L'application du procédé Perox à l'échelle industrielle a mis l'accent sur le phénomène d'adaptation mais aussi sur le dimensionnement des réacteurs UV qu'il faudrait adapter au contexte des TARs traitées.

Les deux traitements, malgré les quelques inconvénients relevés à propos du procédé Perox, aboutissent à des performances comparables à celle du traitement de référence appliqué aux sites étudiés. Ce résultat constitue donc une validation de ces traitements pour une généralisation de leur utilisation dans d'autres sites de même nature (TARs) mais aussi à d'autres types de sites tels que les hôpitaux et les spas. L'utilisation du ClO_2 pour le traitement des eaux dans les hôpitaux (ou dans les réseaux de distribution d'eau potable) semble appropriée du fait que cette eau est une eau potable, généralement pauvre en matières organiques. De ce fait, l'inconvénient relevé plus haut à propos de la faible capacité de dégradation de la matière organique du ClO_2 ne constitue pas, ici, un frein à son utilisation.

L'étude en grandeur réelle a permis par ailleurs de valider une modalité d'échantillonnage des biofilms, qui, malgré les quelques inconvénients relevés lors de l'étude, permet un suivi simplifié et efficace des biofilms qui doit s'ajouter au suivi de l'eau de refroidissement. Ces deux types de suivi doivent être complémentaires car le suivi des biofilms, caractérisé par une plus grande inertie de ses indicateurs, permet de mieux appréhender l'efficacité des biocides. Le suivi des biofilms doit être réalisé dans des conditions adéquates pour la mise en évidence de l'état de contamination des TARs et il doit être préconisé d'utiliser des supports de même nature que ceux des installations de refroidissement (ou de distribution d'eau).

Ces études ont permis également de comparer la pertinence des différents indicateurs utilisés dans ces études. Ceux liés à l'activité métabolique des biofilms et à la viabilité des cellules (ATP et bactéries cultivables) sont les plus sensibles. A ce titre, ils pourraient constituer un paramètre de suivi opérationnel et rapide, notamment pour apporter des mesures curatives en cas de contaminations excessives en attendant les résultats des autres indicateurs. Ainsi, pour les traitements qui se sont révélés efficaces, les concentrations les plus faibles d'ATP ont toujours été associées à des concentrations également faibles de bactéries cultivables.

Les indicateurs caractérisés par une inertie plus grande : bactéries totales et *Lp* totales, ne semblent pas être pertinents pour le suivi opérationnel du fait de la complexité des techniques d'analyses et du temps nécessaire à leur mise en œuvre, mais aussi du peu d'informations qu'ils peuvent donner à court terme. L'évaluation de l'efficacité des biocides vis-à-vis de ces indicateurs permet néanmoins de mettre en évidence d'éventuel effet de « décapitation » des biofilms.

Les amibes ont régulièrement été détectées dans les biofilms durant cette étude et dans certains cas, nous avons pu mettre en évidence une relation entre les concentrations des amibes et les concentrations des bactéries. Les concentrations des amibes seraient étroitement liées et influencées par celles des bactéries. Cette relation est cohérente avec le mode de nutrition des amibes par phagocytose des bactéries. Leur intégration dans le protocole de suivi opérationnel pourrait aussi constituer un intérêt majeur qui va dans le même sens que l'intégration du biofilm dans le suivi. Le niveau de contamination en amibes (sous leur différentes formes : trophozoïtes ou kystes) pourrait informer sur les risques de contamination par les légionelles, notamment du fait de l'implication des amibes dans leur multiplication et leur protection contre l'action des biocides.

L'étude de l'écologie des légionelles dans la source « S » va dans ce sens et met en évidence le rôle des biofilms mixtes (protozoaires et bactéries) dans la multiplication des légionelles virulentes. Il faut noter ici que nous n'avons pas pu isoler de légionelles à partir de l'eau circulante de cette source. Pourtant, notre étude a montré la persistance des légionelles dans cette source et la forte virulence des isolats environnementaux vis-à-vis des amibes, un hôte naturel connu pour augmenter la virulence de *Legionella* à l'égard des macrophages humains (Neumeister *et al.*, 2000). Par ailleurs, cette étude a montré la capacité de persistance des espèces de *Legionella pneumophila* dans un tel écosystème, probablement en relation avec les conditions de température et la présence d'hôtes naturels. Enfin, nous avons démontré la forte biodiversité de *L. pneumophila* dans son écosystème naturel, biodiversité qui se manifeste par des traits immunologiques (sérogroupes) mais aussi par des traits moléculaires. Nous avons également étudié l'effet du traitement Perox vis-à-vis de la virulence de certaines souches environnementales. L'ensemble de ces données ne montre aucune modification de la virulence. Néanmoins le nombre d'analyses réalisées et de souches testées ne semblent pas suffisants pour qu'une conclusion puisse être avancée à ce sujet. Une étude similaire, plus approfondie en incluant les deux procédés de traitement et un nombre suffisant de souches, devrait être faite pour évaluer l'effet de ces procédés sur la virulence des légionelles.

Malgré la présence des formes cultivables de *L. pneumophila* dans les biofilms de la source Soufre, elles n'ont pas pu être maintenues dans les biofilms lors des essais expérimentaux des traitements Perox et Securox. Durant le traitement par le couple H₂O₂ (50 ppm)/UV les formes cultivables ont plus ou moins été maintenues dans les biofilms et leur concentration s'est avérée significativement plus faible dans les biofilms traités. Mis à part ce résultat, aucune autre conclusion à propos de l'effet des autres traitements vis-à-vis des *Lp* cultivables n'a pu être tirée. Néanmoins nous pouvons faire le rapprochement avec la performance des traitements vis-à-vis des autres indicateurs, notamment les *Lp* totales, pour déduire que les *Lp* cultivables seraient également sensibles à ces traitements, notamment lorsqu'elles sont planctoniques, état qui est le plus concerné lors de la formation d'aérosols.

Ce résultat ne remet pas en cause le choix des biofilms environnementaux pour l'évaluation de l'efficacité de ces procédés de traitement. En effet on aurait pu utiliser des biofilms reconstitués et notamment chargés par de fortes concentrations de légionelles. Néanmoins, l'utilisation de ces biofilms obtenues dans des conditions maîtrisées représente deux inconvénients majeurs :

- cette démarche ne reflète pas les conditions rencontrées dans les installations réelles notamment suite à l'utilisation de souches de laboratoire, qui ont parfois des sensibilités vis-à-vis des biocides différentes de celles des isolats environnementaux ;
- l'utilisation de biofilms reconstitués avec des souches de laboratoire pourrait réduire les interactions microbiennes que l'on peut rencontrer dans des biofilms environnementaux et qui pourraient jouer un rôle dans le comportement de ces biofilms vis-à-vis des biocides.

D'autres solutions pourraient être envisagées pour l'optimisation de la démarche expérimentale adoptée dans nos études. Ces solutions devraient en premier lieu favoriser le maintien des légionelles dans les biofilms. Cet objectif pourrait être obtenu par plusieurs modifications de cette démarche :

- l'utilisation de l'eau de la source « Soufre » comme « eau de recirculation » dans le dispositif expérimental, tout en réduisant le volume de recirculation pour limiter les problèmes techniques liés à l'utilisation d'un volume de 100 L à chaque essai ;
- l'augmentation des températures du circuit expérimental à des valeurs permettant au moins le meilleur maintien des légionelles cultivables (30°C par exemple) ;
- l'ensemencement du circuit de traitements par des concentrations élevées de légionelles. Cet inoculum devrait être constitué d'un mélange de souches isolées précédemment du même écosystème que les biofilms (source « S »). Les légionelles ainsi inoculées en suspension pourraient ensuite intégrer les biofilms. Cette éventualité devrait néanmoins se faire avec les plus grandes précautions notamment pour éviter la contamination des opérateurs.

Ainsi, ces modifications, si elles permettent le maintien des légionelles dans les biofilms, permettraient de mettre en évidence l'effet de ces traitements sur les légionelles cultivables dans un écosystème proche de celui naturel.

VIII.2 Perspectives

Le phénomène d'adaptation au stress oxydatif n'a pas été clairement mis en évidence lors des traitements par le couple H₂O₂/UV. Ceci ne signifie pas qu'il n'a pas eu lieu. Il a probablement été

masqué par l'effet de la privation nutritionnelle. Sa mise en évidence pourrait se faire par plusieurs démarches :

- un criblage de l'activité catalase par des tests *in situ* ou par des méthodes moléculaires pour rechercher le gène de la catalase (ou de la SOD dismutase) et son niveau d'expression (PCR et RT-qPCR). La RT-qPCR permettrait en effet de déterminer le niveau d'expression du gène de la catalase après l'exposition des bactéries à différentes concentrations d'H₂O₂. Ces bactéries peuvent être sous forme de suspension ou de biofilms uni- ou multi-espèces (notamment des biofilms naturels) ;
- par l'étude de la sensibilité des bactéries traitées à différentes doses d'H₂O₂ en comparaison avec des phénotypes sauvages (test de stress). Des essais de ce type (tests de stress) ont été réalisés sur des souches environnementales de *L. pneumophila* traitées pendant 60 min mais les résultats ne sont pas concluants, probablement du fait que cette bactérie ne possède pas de réponse adaptative à l'H₂O₂ (Bandyopadhyay *et al.*, 1998 ; 2000 ; 2003).

L'adaptation au stress oxydatif des communautés microbiennes des biofilms sous les effets des traitements appliqués suppose une modification de la diversité et de la composition de ces communautés. Nous avons montré, grâce à un essai catalase *in situ*, que les bactéries cultivables possédant l'activité catalase deviennent majoritaires dans la fraction des bactéries cultivables. L'étude de la diversité de ces communautés microbiennes, notamment celle des légionelles, pourrait être faite par des méthodes d'empreinte moléculaire. Cette étude pourrait nous informer sur des modifications de la composition des communautés et définir celles qui sont les plus résistantes, notamment parmi les légionelles, qui par ailleurs n'ont pas systématiquement été isolées par culture. Dans cette perspective, il serait intéressant de mettre au point un test d'analyse globale du biofilm au niveau moléculaire (similaire aux analyses du microbiome par métagénomique).

Les effets de la privation nutritionnelle sur les biofilms non pas pu être analysés lors de nos études. Les conclusions que nous avons mentionnées sur ces effets pour expliquer le mode d'action de l'H₂O₂/UV ont été tirées d'autres études similaires. Il serait possible de mettre en évidence ces effets par :

- le marquage des biofilms traités (ou carencés) directement sur les supports afin de mettre en évidence des zones de mortalité (et d'activité) cellulaire, en comparaison avec des biofilms non traités (ou non carencés en nutriments) ;
- de mesurer l'épaisseur des biofilms pour mettre en évidence le détachement des fractions de ce dernier et le potentiel de diffusion des biocides.

Sur le plan opérationnel, les performances transitoires mais acceptables de l'H₂O₂ seul montre que les concentrations appliquées ne sont pas létales. Il est possible d'envisager des traitements à l'H₂O₂ seul en traitement choc et en appliquant des concentrations plus élevées et létales. Cette option pourrait, dans certains, cas être une solution pertinente pour éviter les modifications nécessaires, parfois lourdes, pour l'intégration des UV dans le procédé de traitement. L'utilisation de biocides en traitement choc devrait néanmoins faire l'objet d'une réflexion du fait du mode de fonctionnement des installations industrielles de type TARs. Dans ces installations, un autre facteur s'impose, c'est la purge des eaux de refroidissement et les appoints qui lui correspondent. Les paramètres d'injection discontinue de biocides devraient être définis en relation avec ce facteur du fait de son effet de dilution et de diminution des concentrations résiduelles du biocide s'ils se produisent (purge et appoint) immédiatement après les injections discontinues.

A l'échelle industrielle, notre étude suggère qu'un protocole précis de suivi des TARs peut être établi en prenant en compte les composants essentiels : eau circulante, biofilms. Ce protocole devrait inclure la mise en place de support de biofilms servant aux analyses, support à élaborer en accord avec la structure des TARs (matériaux en particuliers). Selon les paramètres à suivre, des seuils d'alerte pourraient ainsi être définis pour que les actions de désinfection soient élaborées au mieux.

Dans cette perspective, la prise en compte du facteur trophique et par conséquent les concentrations en matières organiques est nécessaire. Par exemple, dans les installations industrielles refroidies par une eau environnementale non traitée (eau de rivière par exemple), des concentrations élevées de matières organiques peuvent être rencontrées. Dans ces cas, il est préconisé d'adapter les doses des traitements pour privilégier une oxydation plus ou moins complète. Il est également possible de traiter cette eau en amont du processus de refroidissement par des procédés physiques, telle que l'ultrafiltration, visant à l'élimination de la matière organique. Ainsi, l'eau résultante serait moins chargée en composés organiques, plus sensible à l'action du traitement, et moins propice au développement microbien.

IX- Bibliographie

IX Bibliographie

A

- Abd H, Weintraub A** (2005) Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environmental Microbiology* **7**:1003-1008.
- Adeleke AA et al** (2001) *Legionella drozanskii* sp nov, *Legionella rowbothamii* sp nov and *Legionella fallonii* sp nov: three unusual new *Legionella* species. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **51**:1151-1160.
- Ahn C, Park M, Joung S, Kim H, Jang K & Oh H** (2003) Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies. *Environmental Science and Technology* **37**:3031-3037.
- Albert-Weissenberger C, Cazalet C & Buchrieser C** (2007) *Legionella pneumophila* a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* **64**: 432-448.
- Al-Fattani MA & Douglas LJ** (2004) Penetration of Candida Biofilms by Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **48**: 3291-3297
- Allegra S, Girardot F, Grattard F, Berthelot P, Helbig JH, Pozzetto B & Riffard S (2011)** Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. *Journal of Applied Microbiology* **110**: 952-961.
- Allegra S, Grattard F, Girardot F, Riffard S, Pozzetto B & Berthelot P** (2010) Longitudinal Evaluation of the Efficacy of Heat Treatment Procedures against *Legionella* spp in Hospital Water Systems by Using a Flow Cytometric Assay. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1268-1275.
- Alleron L, Merlet N, Lacombe C, Frère J** (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but not culturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* **57**: 497-502.
- Allison KR, Brynildsen MP, & Collins J** (2011) Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. *Current Opinion in Microbiology* **14**:593-598.
- Amaro F, Gilbert JA, Owens S, Trimble W, Shuman HA** (2012) Whole-Genome Sequence of the Human Pathogen *Legionella pneumophila* Serogroup 12 Strain 570 COH. *Journal of Bacteriology* **194**:1613-1614.
- Anand CM et al.** (1983) Interaction of *Legionella pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *Journal of Hygiene* **91**:167-178.
- Aslund F, Zheng M, Beckwith J & Storz G** (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol disulfide status. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 6161-6165.
- Ashby MJ, Neale JE, Knott S J & Critchley IA** (1994) Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **33**: 443-452.
- Atlas RM** (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology* **1**:283-293.
- Aurell H, Catala P, et al.** (2004) Rapid Detection and Enumeration of *Legionella pneumophila* in Hot Water Systems by Solid-Phase Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1651-1657.

B

- Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L & Leibler S** (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**:1622-1625.
- Bandyopadhyay P & Steinman HM** (1998) *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the katB gene and studies of KatB function. *Journal of Bacteriology* **180**:5369-5374.
- Bandyopadhyay P & Steinman HM** (2000) Catalase-Peroxidases of *Legionella pneumophila*: Cloning of the katA Gene and Studies of KatA Function. *Journal of Bacteriology* **182**: 6679-6686.
- Bandyopadhyay P, Byrne B, Chan Y, Swanson MS & Steinman HM** (2003) *Legionella pneumophila* Catalase-Peroxidases Are Required for Proper Trafficking and Growth in Primary Macrophages. *Infection and Immunity* **71** (8): 4526-4535.
- Banga S, Gao P, Shen X, Fiscus V, Zong W, Chen L, Luo Z** (2007) *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Dcl2 protein family Proceedings. *National Academy Science USA* **104**:5121-5126.

- Bangsberg JM** (1997) Antigenic and genetic characterization of *Legionella* proteins: contributions to taxonomy, diagnosis and pathogenesis. *APMIS Supplementum* **70**:1-53.
- Barker J, Scaife H, Brown MR** (1995) Intraphagocytic Growth Induces an Antibiotic-Resistant Phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* **39**: 2684-2688.
- Barker J, Lambert PA & Brown MRW** (1993) Influence of Intra-Amoebic & Other Growth Conditions on the Surface Properties of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **61**: 3503-3510.
- Barker J, Brown MR, Collier PJ, Farrell I & Gilbert P** (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2420-2425
- Baum MM, Kainović A, O'Keefe T, Pandita R, McDonald K, Wu S & Webster P** (2009) Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiology* **9**:103
- Behets J, Declerck P, Yasmine Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F** (2007) A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water Research* **41**: 118-126.
- Bell T, Newman J A, Silverman B W, Turner S L & Lilley A K** (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* **436**:1157-1160.
- Benson RF, Fields BS** (1998) Classification of the genus *Legionella*. *Seminars in Respiratory Infections* **13**:90-99.
- Berk S, Ting R, Turner G, Ashburn R** (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**:279-286.
- Berney M, Vitala M, Hülshoffa I, Weilenmanna HU, Thomas Eglia T, Hammesa F** (2008) Rapid cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Research* **42**: 4010-4018.
- Berry D, Xi C, Raskin L** (2006) Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 297-302.
- Besemer K, Singer G, Hödl I & Battin TJ** (2009) Bacterial community composition of stream biofilms in spatially variable flow environments. *Appl Environ Microbiol* **75**:7189-7195.
- Besemer K, Singer G, Limberger R et al.** (2007) Biophysical Controls on Community Succession in Stream Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:4966-4974.
- Bitar DM, Molmeret M, Abu Kwaikc Y** (2004) Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila* International. *Journal of Medical Microbiology* **293**: 519-527.
- Black WC, Berk SG** (2003) Cooling towers: a potential environmental source of slow-growing mycobacterial species. *AIHA J (Fairfax, Va)* **64**:238-42.
- Bornstein N, Marmet D, Surgot M, Nowicki M, Arslan A, Esteve J, Fleurette J** (1989) Exposure to *Legionellaceae* at a hot spring spa: A prospective clinical and serological study. *Epidemiology and Infection* **102**:31-36.
- Brooun A, Liu S & Lewis K** (2000) A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:640-646.
- Borella P, Guerrieri E** (2005) Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review* **11**: 355-380.
- Bouyer S, Imbert C, Rodier M-H, Héchard Y** (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ Microbiol* **9**: 1341-1344.
- Bowers B & Olszewski T E** (1972) Pinocytosis in *Acanthamoeba castellanii* Kinetics and morphology. *J Cell Biol* **53**:681-694.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R** (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* **13**: 20-26.
- Brassinga A, Kinchen J, Cupp M, Day S, Hoffman P, Sifri C** (2010) Caenorhabditis is a metazoan host of *Legionella*. *Cell Microbiol* **12**: 343-361.
- Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE** (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Annals of Internal Medicine* **90**:656-658.
- Brieland J, McClain M, Heath L, Chrisp C, Huffnagle G, LeGendre M, Hurley M, Fantone J, Engleberg NC** (1996) Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect Immun* **64**: 2449-2456.

- Brieland J, Fantone J C, Remick D G, LeGendre M, McClain M, Engleberg NC** (1997) The Role of *Legionella pneumophila*-Infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect Immun* **65**(12): 5330-5333.
- Brözel VS & Cloete TE** (1992) The effect of bactericide treatment on planktonic bacterial communities in water cooling systems. *Water SA* **18**: 87-92.
- Brooun A, Liu S & Lewis K** (2000) A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 640-646.
- Bruggemann H, Cazalet C & Buchrieser C** (2006) Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Current Opinion in Microbiology* **9**:86-94.
- C**
- Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM & O'Toole GA** (2007) Inverse Regulation of Biofilm Formation and Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriology* **189**: 3603-3612.
- Camper AK, Lechevallier MW, Broadway SC & McFeters GA** (1985) Growth and Persistence of Pathogens on Granular Activated carbon filter. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1378-1382.
- Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C et al.** (2010) Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaire's disease. *PLoS Genetic* **6**: e1000851.
- Cazalet C, Jarraud S, Ghavi-Helm Y, Kunst F, Glaser P, Etienne J, Buchrieser C** (2008) Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Research* **18**:431-441.
- Chandy JP & Angles ML** (2001) Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. *Water Research* **35**: 2677-2682.
- Chenier MR, Beaumier D, Fortin N, Roy R, Driscoll B T, Lawrence J R & Greer C W** (2006) Influence of nutrient inputs, hexadecane and temporal variations on denitrification and community composition of river biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 575-584.
- Cianciotto NP** (2001) Pathogenicity of *Legionella pneumophila* International. *Journal of Medical Microbiology* **5**:331-343.
- Cirillo JD, Falkow S & Tompkins LS** (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* **62**:3254-3261.
- Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S & Tompkins LS** (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **67**: 4427-4434.
- Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H** (2005) Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **73**: 4272-4280.
- Chang CW, Hwang Y, Cheng W & Chang CP** (2007) Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 1636-1644.
- Chang CW, Kao CH, & Liu YF** (2008) Heterogeneity in chlorine susceptibility for *Legionella pneumophila* released from *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Journal of Applied Microbiology* **17**: 1364-5072.
- Chavez-Munguia B, Omana-Molina M, Gonzalez-Lazaro M, Gonzalez-Robles A, Bonilla P & Martinez-Palomo A** (2005) Ultrastructural study of encystation & excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J Eukaryot Microbiol* **52**:153-8.
- Chen X & Stewart PS** (1996) Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction. *Environ Sci Technol* **30**:2078-2083.
- Chen X & Stewart PS** (2000) Biofilms removal caused by chemical treatments. *Water Research* **34**: 4229-4233.
- Chen X & Stewart PS** (2002) Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 718-720.
- Chiang SM, Schellhorn HE** (2012) Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **525**: 161-169.
- Cloete TE, Smith F** (1989) The use of planktonic bacterial populations in open and closed recirculating water cooling systems for the evaluation of biocides. *International Biodeterioration* **25**: 115-122.
- Cabisco E, Tamarit J, Ros J** (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internal TL Microbiol* **3**:3-8.

- Cochran WL, McFeters GA & Stewart PS** (2000 a) Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of Applied Microbiology* 88: 22-30.
- Cochran WL, Suh SJ, McFeters GA, Stewart PS** (2000 b) Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of Applied Microbiology* 88: 546-553.
- Collier PJ, Austin P & Gilbert P** (1991) Isothiazolone biocides: Enzyme-inhibiting pro-drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 74:195-201.
- Conover G, Derré I, Vogel J, Isberg R** (2003) The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocator substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Molecular Microbiology* 48:305-321.
- Cooper IR, White J, Mahenthiralingam E, Hanlon GW** (2008) Long-term persistence of a single *Legionella pneumophila* strain possessing the mip gene in a municipal shower despite repeated cycles of chlorination. *Journal of Hospital Infection* 70: 154 -159.
- Costerton JW** (2007) *The Biofilm Primer*, Springer 199pp.
- Cotuk A, Dogruoz N, Zeybek Z, Kimiran-Erdem A, Ilham-Sungur E** (2005) The effects of *pseudomonas* and *Aeromonas* strains on *Legionella pneumophila* growth. *Annals of Microbiology* 55:219-224.
- D**
- Dabrowska A, Świetlik J and Nawrocki J** (2003) Formation of aldehydes upon ClO₂ disinfection. *Wat Res* 37:1161-1169.
- D'Auria G, Jimenez-Hernandez N, Peris-Bondia F, Moya A, Latorre A** (2010) *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics* 11:181.
- Davey ME, O'Toole** (2000) GA Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microb Mol Rev* 64: 847-867.
- Davies DG & Geesey GG** (1995) Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during Biofilm Development in Continuous Culture. *Applied and environmental Microbiology* 61 : 860-867.
- De Beer D, Srinivasan R & Stewart PS** (1994) Direct Measurement of Chlorine Penetration into Biofilms during Disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4339-4344.
- De Beer D & Stoodley P** (2006) Microbial Biofilms. *Prokaryotes* 1:904-937.
- De Buck E, Anné J, Lammertyn** (2007) The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 153:3948-3953.
- De Buck et al** (2004) A putative twin-arginine translocation pathway in *Legionella pneumophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 654-661.
- Declerck P, Vanysacker L, Hulsmans A, Lambert N, Liers S, Ollevier F** (2010) Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*. *Water Research* 44:703-710.
- Declerck et al**, (2007) Detection of *Legionella* spp and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research* 41:3159 -3167.
- Declerck P, Behets J, Delaedt Y, Margineanu A, Lammertyn E, Ollevier F** (2005) Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microbial Ecol* 50:536-549.
- de Felipe K, Glover R, Charpentier X, Anderson O, Reyes M, Pericone C, Shuman H** (2008) *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *Plos Pathogens* 4:e100017.
- de Kievit TR & Iglewski BH** (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity* 68:4839-4849.
- Delaquis PJ, Caldwell DE, Lawrence JR 1 McCurdy AR** (1989) Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microbial Ecology* 18: 199-210.
- Delgado-Viscogliosi P, Simonart T, et al.** (2005). Rapid Method for Enumeration of Viable *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* spp. in Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4086-4096.
- Desai R, Welsh C, Summy M, Farone M, Newsome AL** (1999) The potential of in situ hybridization & an immunogold assay to identify *Legionella* associations with other microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 37:155-164.

- Devos L, Boon N & Verstraete W** (2005) *Legionella pneumophila* in the environment: the occurrence of a fastidious bacterium in oligotrophic conditions. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **4**: 61-74.
- Diederer BMW, Jong JMA, Aarts I, Peeters MF, Zee A** (2007) Molecular evidence for the ubiquitous presence of *Legionella* species in Dutch tap water installations. *J Water and Health* **5**:375-383.
- Dietrich C, Heuner K, Br& BC, Hacker J & Steinert M** (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect Immun* **69**: 2116-2122.
- Djadour MF, Ogino C, Matsumura S, Nakamura S, Shimizu N** (2006) Disinfection of *Legionella pneumophila* by ultrasonic treatment with TiO₂. *Water research* **40**:1137-1142.
- Doléans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandernes F, Etienne J, Jarraud S** (2004) Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *Journal of Clinical Microbiology* **4**:458-460;
- Doléans -Jordheim A, Akermi M et al.** (2006) Growth-phase-dependent mobility of the *lvh*-encoding région in *Legionella pneumophila* strain Paris. *Microbiology* **152** : 3561-3568.
- Domingue EL, Tyndall RL, Mayberry WR & Pancorbo OC** (1988) Effects of three oxidizing biocides on *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Appl Environ Microbiol* **54**:741-747.
- Donlan R M, Forster T, Murga R, Brown E, Lucas C, Carpenter J & Fields B** (2005) *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling* **21**:1-7.
- Donlan RM** (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8**:881-890.
- Dowling et al.** (1992) Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiological reviews* **56**:32-60.
- Drenkard E** (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection* **5**: 1213-1219.
- Dukan S, Levi Y & Touati D** (1997) Recovery of Culturability of an HOCl-Stressed Population of *Escherichia coli* after Incubation in Phosphate Buffer: Resuscitation or Regrowth? *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4204-4209.
- Dykova I, Pindova Z, Fiala I, Dvorakova H & Machackova B** (2005) Fish-isolated strains of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967: morphology, phylogeny and molecular diagnosis of the species in tissue lesions. *Folia Parasitologica* **52**: 295-303.
- E**
- Edelstein PH** (1982) Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J Clin Microbiol* **16**: 697-699.
- Eichler S, Christen R, Claudia Holtje C, Petra Westphal P, Botel J, Brettar I, Mehling A & G Hofle M** (2006) Composition and Dynamics of Bacterial Communities of a Drinking Water Supply System as Assessed by RNA- and DNA-Based 16S rRNA Gene Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:1858-1872.
- Elkins JG, Hasset DJ, Stewart PS, Schweizer HP & Mcdermott RT** (1999) Protective Role of Catalase in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Resistance to Hydrogen Peroxide . *Applied and nvironmental Microbiology* **65**: 4594-4600.
- El Sibae MM** (1993) Detection of free-living amoeba (*Acanthamoeba polyphaga*) in the air conditioning systems. *J Egypt Soc Parasitol* **23**: 687-690.
- Emtiazi F, Schwartz T, Marten SM, Krolla-Sidenstein P, Obst U** (2004) Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Research* **38**: 1197-1206.
- Escobar IC, Randall AA** (2001) Assimilable organic carbon (AOC) and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC): complementary measurement. *Water research* **35** : 4444-4454.
- Evans KL, Warren PH & Gaston KJ** (2005) Species-energy relationships at the macroecological scale: a review of the mechanisms. *Biological Reviews* **80**:1-25.
- F**
- Fang GD, Yu VL, Vickers RM** (1989) Disease due to the *Legionellaceae* (other than *Legionella pneumophila*) Historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. *Medicine B*, **68**:116 132.
- Feeley J, Gibson R, Gorman G, Langford N, Rasheed J, Mackel D, Baine W** (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **10**: 437-441.

- Ferhat M, Atlan D, Vianney A, Lazzaroni JC, Doublet P, et al.** (2009) The TolC Protein of *Legionella pneumophila* Plays a Major Role in MultiDrug Resistance and the Early Steps of Host Invasion. *PLoS ONE* **4**: e7732.
- Fernandez J, Lopez P, Orozco D, Merino J** (2002) Clinical Study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain European. *Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21**:729-735
- Fields BS, Benson RF & Besser RE** (2002) *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology reviews* **15**: 506-526.
- Flemming HC & Wingender J** (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* **43**: 1-8.
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL & Pope DH** (1981) Ecological Distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 9-16.
- Fliermans CB & Harvey RS** (1984) Effectiveness of 1-bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin against *Legionella pneumophila* in a cooling tower. *Appl Environ Microbiol* **47**: 1307-1310.
- Fraser D et al** (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia New England. *Journal of Medicine* **297**:1189-1197.
- Frahm E & Obst U** (1994) Application of New Methods to Regular Water Hygiene Control OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water.
- Fry NK et al** (1991) The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *Journal of General Microbiology*, **137**:1215-1222.
- Fry NK, Bangsberg JM, Bernander et al.** (2000) Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplify length polymorphism analysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**: 773-780.
- Fucci L, Oliver CN, Coon M, Stadtman ER** (1983) Inactivation of key metabolic enzymes by mixed function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proc Natl Acad Sci* **80**:1521-1525
- G**
- Gabay JE, Blake M, Niles WD & Horwitz MA** (1985) Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *Journal of bacteriology* **162**: 85-91.
- Gagnon GA, Rand JL, O'Leary KC, Rygel AC, Chauret C Andrews RC** (2005) Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water Research* **39**:1809-1817.
- Gao LY & Abu Kwaik Y** (2000) The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* **2**:79-90.
- Gao Y, Zhou P, Lin Y E, Vidic RD & Stout JE** (2001) Efficacy of DBNPA against *Legionella pneumophila*: experimental results in a model water system. *ASHRAE 107 (Part1)*(4432).
- Garcia MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD & Abu Kwaik Y** (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol* **9**: 1267-1277.
- Garduno RA, Garduno E, Hiltz M & Hoffman PS** (2002) Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* Gives Rise to a Differentiated Form Dissimilar to Stationary-Phase Forms. *Infection and Immunity* **70**: 6273-6283.
- Garduno RA, Garduno E & Hoffman PS** (1998) Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infection and immunity* **66**:4602-4610.
- Garny K, Horn H & Neu RT** (2008) Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. *Bioprocess Biosyst Eng* **31**:619-629.
- Ge J, Xu H, Li T, Zhou Y, Zhang Z, Li S, Liu L, Shao F** (2009) A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the I-kappaB family of inhibitors Proceedings. *National Accademy Science USA* **106**:13725-13730.
- Girvan MS, Campbell CD, Killham K, Prosser JI & Glover LA** (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology* **7**:301-313.
- Gilbert P, Maira-Litran T** (2002) The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Advances in Microbial Physiology, Academic Press* **46**: 203-256.
- Glick TH et al** (1978) Pontiac fever, An epidemic of unknown etiology in a health department: I Clinical and epidemiologic aspects American. *Journal of Epidemiology* **107**:149-160.

- Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C** (2009) *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. *Infection Genetics Evolution* **9**: 727-739.
- Gordon G** (1992) Water chemistry of the oxy-chlorine species Proceedings of the Second International Symposium on Chlorine Dioxide: Drinking Water Issues, Houston, Texas.
- Goslan EH, Krasner SW, Bower M, Rocks SA, Holmes P, Levy LS, Parsons SA** (2009) A comparison of disinfection by-products found in chlorinated & chloraminated drinking waters in Scotland. *Water research* **43**: 4698-4706.
- Gotz F** (2002) Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* **43**:1367-1378.
- Grattard F, Ginevra C, Riffard S, Ros A, Jarraud S, Etienne J, Pozzetto B** (2006) Analysis of the genetic diversity of *Legionella* by sequencing the 23S-5S ribosomal intergenic spacer region : from phylogeny to direct identification of isolates at the species level from clinical specimens. *Microbes Infection* **8**: 73-83.
- Greub G & Raoult D** (2003) Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmannella vermiformis* *Res Microbiol* **154**:619-621.
- Greub G & Raoult D** (2004) Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* **17**: 413-433.
- Grimm D, Ludwig W** (2001) Development of 18S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes for Specific Detection of *Hartmannella* and *Naegleria* in *Legionella* - positive Environmental Samples. *Systematic & Applied Microbiology* **24**: 76-82.
- Gruber-Duvernay B** (2001) Dix ans de surveillance épidémiologique des pneumopathies à Aix-les-Bains (1990-1999). *Presse Thermale et Climatique* **138**:13-25.
- Gupta SK, Imperiale TF, Sarosi GA** (2001) Evaluation of the Winthrop-University Hospital criteria to identify *Legionella pneumonia*. *Chest* **120**:1064-1071.
- Guo M, Huang J, Hu HY & Liu WJ** (2011) Growth & Repair Potential of Three Species of Bacteria in Reclaimed Wastewater after UV Disinfection. *Biomed Environ Sci* **24**:400-407.
- Guo M, Hu H, Bolton JR, Gamal El-Din M** (2009) Comparison of low- and medium-pressure ultraviolet lamps: Photoreactivation of *Escherichia coli* and total coliforms in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Water research* **43**: 815 - 821.
- Guerrieri E, Bondi M, Sabia C, de Niederhausern S, Borella P and Messi P** (2008) Effect of Bacterial Interference on Biofilm Development by *Legionella pneumophila*. *Curr Microbiol* **57**:532-536.
- H**
- Harf C, Goffinet S, Meunier O, Monteil H & Colin DA** (1997) Flow Cytometric Determination of Endocytosis of Viable Labelled *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba palestinensis*. *Cytometry* **27**:269-274.
- Harshey R M** (1994). Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* **13**: 389-394.
- Hayes F** (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* **301**:1496-1499.
- Heller R, Holler C, Sussmuth R, Gundermann K** (1998) Effect of salt concentration on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* **26**: 64-68.
- Heuner K, Dietrich C, Skriwan C, Steinert M & Hacker J** (2002) Influence of the alternative 28 factor on virulence & flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **70**:1604-1608.
- Her N, Amy G, Foss D & Cho J** (2002) Variations of molecular weight estimation by HP-Size Exclusion Chromatography with UVA versus online DOC detection. *Environ Sci Technol* **36**:3393-3399.
- Her N, Amy G, McKnight D** (2003) Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Res* **37**: 4295-4303.
- Hervet E, Charpentier X, Vianney A, Lazzaroni JC, Gilbert C, Atlan D & Doublet P** (2011) Protein Kinase LegK2 Is a Type IV Secretion System Effector Involved in Endoplasmic Reticulum Recruitment and Intracellular Replication of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* **79**:1936-1950.
- Hilbi H, Jarraud S, Harland E, Buchrieser C** (2010) Update on Legionnaire's disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol Microbiol* **76**: 1-11.
- Hoellein TJ, Tank JL, Kelly JJ, Rosi-Marshall EJ** (2010) Seasonal variation in nutrient limitation of microbial biofilms colonizing organic and inorganic substrata in streams. *Hydrobiologia* **649**:331-345.
- Hofmann R, Andrews RC & Ye Q** (1999) Impact of *Giardia* Inactivation Requirements on ClO₂ By-Products. *Environmental technology* **20**: 147-158.

- Horwitz MA** (1983) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *Journal of Experimental Medicine* **158**:2108-2126.
- Hoyer O** (1998) Testing performance and monitoring of UV systems for drinking water disinfection. *Water Supply* **16**:424-429.
- Howard K, & Inglis TJ** (2003) The effect of free chlorine on *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Res* **37**:4425-4432.
- Hsu BM, Ma PH, Liou TS, Chen JS, Shih FC** (2009) Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from hot spring recreation areas in the central range. *Taiwan J Hydrol* **367**:249-254.
- Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov MC, Molin S & Leo E** (2001) The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**: 2517-2528.
- Huck PM** (1990) Measurement of biodegradable organic matter and bacterial growth in drinking water. *J AmWater Works Assoc* **82**:78-86.
- Hunt SM, Werner EM, Hamilton MA & Stewart PS** (2004) Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7418-7425.
- Hunt AP & Parry JD (1998)** The effect of substratum roughness and river flow rate on the development of a freshwater biofilm community. *Biofouling* **12** : 287-303.
- Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M & Colwell RR** (2008) Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Current Opinion in Biotechnology* **19**:244-247.
- Hussong D, Colwell RR, O'Brien M, Weiss E, Pearson AD, Weiner RM & Burge WD** (1987) Viable *Legionella pneumophila* Not Detectable by Culture on Agar Media. *Biotech* **5**: 947-950.
- I**
- Init I, Lau YL, Arin Fadzlun A, Foad AI, Neilson RS & Nissapatorn V** (2010) Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Tropical Biomedicine* **27**:566-577.
- Isberg R, O'Connor T, Heidtman M** (2009) The *Legionella pneumophila* réplication vacuole: making a cosy niche inside host cell. *Nature Reviews Microbiology* **7**:13-24.
- Ivancev-Tumbas I, Dalmacija B** (2001) Effects of coagulation processes on aldehydes formation in groundwater treated with common oxidative agents. *Water Res* **35**: 3950-8.
- J**
- Jackson CR, Churchill PF, & Eric Roden EE** (2001) Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* **82**: 555-566.
- Jacobi S, Schade R, Heuner K** (2004) Characterization of the alternative factor sigma 54 and the transcriptional regulator FleQ of *Legionella pneumophila* which are both involved in the régulation cascade of flagellar gene expression. *Journal of Bacteriology* **186**:2540-2547
- Jarraud S, Freney J** (2006) *Legionella* Ed TEC and DOC, Lavoisier, Paris.
- Jefferson KK** (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters* **236**: 163-173.
- Jepras RL, Fitzgeorge RB & Baskerville A** (1985) A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs *Journal of Hygiene, Cambridge* **95**:29-38.
- Joyce E, Phull SS, Lorimer JP, Mason TJ** (2003) The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species Ultrasonics. *Sonochemistry* **10**: 315-318.
- Jules M, Buchrieser C** (2007) *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life & the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett* **581**:2829-2838.
- K**
- Keer JT, Birch L** (2003) Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods* **53**: 175-183.
- Keevil CW, Mackerness CW** (1990) Biocide treatment of biofilms. *International Biodeterioration* **26**: 169-179.
- Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K** (2004) Specialized persister cells & the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 8172-8180.
- Kilvington S, Price J** (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* **68**: 519-525.

- Kim B R, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA & Kendall A M** (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research* **36**: 4433-4444.
- Kim MJ, Sohn JW, Park DW, Park SC, Chun BC** (2003) Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* **41**: 2974-9.
- Kohler RB, Zimmerman SE, Wilson E, Allen SD, Edelstein PH, Wheat LJ, White AC** (1981) Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease; detection and partial characterization of urinary antigen. *Ann Intern Med* **94**: 601-605.
- Ko K, Park M, Lee K, Yun Y, Woo S, Miyamoto H, Kook Y** (2002) Application of RNA polymérase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 2653-2658.
- Kool JL, Carpenter JC & Fields BS** (1999) Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *Lancet* **353**:272-277.
- Kilb B, Lange B, Schaule G, Flemming HC, Wingende J** (2003) Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves International. *Journal of Hygiene and Environmental Health* **206**:563-573.
- Korenblum E, Von Der Weid I, Santos ALS et al.** (2005) Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B firmus* H2O-1 and *B licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *J Appl Microbiol* **98**:667-75.
- Kreft JU, Picioreanu C, Wimpenny WT J & van Loosdrecht MCM** (2001) Individual-based modelling of biofilms. *Microbiology* **147**: 2897-2912.
- Kubori T, Shinzawa N, Kanuka H, Nagai H** (2010) *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *Plos Pathogen* **6**:e100216.
- Kuchta JM, Navratil JS, Shepherd ME, Wadowsky RM, Dowling JN, States SJ, Yee RB** (1993) Impact of Chlorine and Heat on the Survival of *Hartmannella vermiformis* & Subsequent Growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* **59**:4096-100.
- Kusic H, Koprivanac N, Bozic AL** (2006) Minimization of organic pollutant content in aqueous solution by means of AOPs: UV- & ozone-based technologies Chemical. *Engineering Journal* **123**:127-137.
- Kusnetsov J M, & Martikainen P J** (1993) Physical, chemical and microbiological water characteristics associated with the occurrence of *Legionella* in cooling tower systems. *Water Research* **27**: 85-90.
- Kusnetsov J M, Keskitalo PJ, Ahonen HE, Tulkki A I, Miettinen IT & Martikainen PJ** (1994) Growth of *Legionella* and other heterotrophic bacteria in a circulating cooling water system exposed to ultraviolet irradiation. *Journal of applied bacteriology* **77**:461-466.
- L**
- Labas MD, Zalazar CS, Brandi RJ & Cassano AE** (2008) Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Biochemical Engineering Journal* **38**:78-87.
- Lasa I, Penades JR** (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**:99-107.
- Latasa C, Solano C, Penades JR, Lasa I** (2006) Biofilm-associated proteins. *C R Biol* **329**:849-857.
- Laue H, Schenk A, Li H, Lambertsen L, R Neu T, Molin S & Ullrich M** (2006) Contribution of alginate & levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* **152**:2909-2918.
- Lazarova V, Savoye P, Janex ML, Blatchley ER & Pommepuy M** (1999) Advanced wastewater disinfection technologies: state of art and perspectives. *Wat Sci Tech* **40**:203-213.
- Leach M, Festger A, Royce A, Williamson C** (2006) UV-Oxidation: Municipal Case Studies and New Applications. *IUVA News* **8**: 11-16.
- Lear G, Anderson MJ, Smith JP, Boxen K, Lewis GD** (2008) Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* **65**: 463-473.
- LeChevallier MW, Shaw N, Kaplan L & Bott T** (1993) Development of a rapid assimilable organic carbon method for water. *Appl Environ Microbiol* **59**:1526-1531.
- LeChevallier MW, cawthon CD & Lee RG** (1988) Inactivation of Biofilm Bacteria. *Applied and environmental Microbiology* **54**:2492-2499.
- LeChevallier M W, Badcock T M & Lee R G** (1987) Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2714-2724.

- Lee BS, Lee JG, Shin DH, Kim E** (2001) Statistical Optimization of Bioluminescence of *Photobacterium Phosphoreum* KCTC2852. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 72-76.
- Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM** (1993) Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: A comparative study. *J Clin Microbiol* **31**: 2764-2768.
- Lemon KP, Higgins DE, Kolter R** (2007) Flagella-mediated motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol* **189**:4418-4424.
- Levi Y** (2001) Écologie microbienne des réseaux d'eau potable et risque microbiologique : l'exemple de *Legionella pneumophila*. *Revue Française des Laboratoires* **336**: 33-37.
- Lewis K** (2008) Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells In: T Romeo (Ed) *Current Topics in Microbiology and Immunology Bacterial Biofilms*, Vol 322, Springer Verlag, Berlin.
- Lewis K** (2001) Riddle of Biofilm Resistance Antimicrobial agents and chemotherapy. *American Society for Microbiology* **45**: 999-1007.
- Lewis K** (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry* **70**: 267-274.
- Lin Y E, Vidic R D, Stout J E & Yu V L** (1998) *Legionella* in Water Distribution Systems. *Journal American Water Works Association* **90**:112-121.
- Livrelli V, De Champs C, Di Martino P, Darfeuille-Michaud A, Forestier C, Joly B,** (1996) Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol* **34**:1963-9.
- Liu Z, Stout J E, Tedesco L, M Boldin, Hwang C & Yu V L** (1995) Efficacy of ultraviolet light in preventing *Legionella* colonization of a hospital water distribution system. *Water Research* **29**:2275-2280.
- Loret J F, Robert S** (2005) Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *J Water Health* **3**:423-433.
- Loret JF & Greub G** (2010) Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment International. *Journal of Hygiene and Environmental Health* **213**: 167-175
- Lurie-Weinberger MN, Gomez-Valero L, Merault N et al.** (2010) The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* doi:10.1016/j.ijmm.2010.04.016.
- M**
- McDade JE, Brenner DJ, Bozeman FM** (1979) Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Annals of Internal Medicine* **90**:659-661
- McCoy WF, Wireman JW & Lashen ES** (1986). Efficacy of methylchloro/methylisothiazolone biocide against *Legionella pneumophila* in cooling tower water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **1**: 49-56.
- MacDonald R & Brözel VS** (2000) Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes *Water Research* **34**: 2439-2446.
- Maiwald M, Helbig JH, Christian PL** (1998) Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *Journal of Microbiological Methods* **33**: 59-79.
- Mah HFC & O'Toole GA** (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9**: 34-39.
- Martin N, Gehr R** (2007) Reduction of photoreactivation with the combined UV/peracetic acid process or by delayed exposure to visible light. *Water Environ Res* **79**:991-9.
- Martiny AC, Jørgensen TM, Albrechtsen HJ, Arvin E & Molin S** (2003) Long-Term Succession of Structure and Diversity of a Biofilm Formed in a Model Drinking Water Distribution System. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6899-6907.
- Martinez SS, Gallegos AA, & Martinez E** (2004) Electrolytically generated silver and copper ions to treat cooling water: an environmentally friendly novel alternative. *International Journal of hydrogen Energy* **29**:921-932.
- Massol-Deya AA, Whallon J, Hickey RF, Tiedje JM** (1995) Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* **61**:769-777.
- Mauchline WS, Araujo R, wait R, Dowsett AB, Dennis PJ & Keevil CW** (1992) Physiology and morphology of *Legionella pneumophila* in continuous culture at low oxygen concentration. *Journal of General Microbiology* **138**: 2371-2380.

- Mayer C, Moritz R, Kirschner C, Borchard W, Maibaum R, Wingender J & Flemming H-C** (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int J Biol Macromol* **26**:3-16.
- McGrane WK** (1995) Ozone, a study of the effects of biocides on *Legionella pneumophila*. *Industrial Water Treatment* **27**:28-32.
- Mechsner K, Fleischmann T, Mason CA, Hamer G** (1991) UV disinfection; short term inactivation and revival. *Water science and technology* **24**:339-42.
- Mérault et al.** (2011) Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. *American Society for Microbiology* doi:10.1128/AEM02261-10.
- Merriam J, Marthur R, Maxfield-Boumil R, Isberg R** (1997) An analysis of *Legionella pneumophila* flil gene : intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis. *Infection and Immunity* **65**: 2497-2501.
- Metz DH, Reynolds K, Meyer M, Dionysiou DD** (2011) The effect of UV/H₂O₂ treatment on biofilm formation potential. *Water Research* **45**:497-508.
- Miller JH** (1992) A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller MB & Bassler BL** (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**:165-199.
- Miyamoto M, Yamaguchi Y, Sasatsu M** (2000) Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculous mycobacteria. *Microbios* **101**:7-13.
- Moffat J, Tompkins L** (1992) A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* Infection and Immunity **70**:69-78.
- Molin S & Tolker-Nielsen T** (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 255-261.
- Molmeret M, Jarraud S, Morin P, Pernin P, Forey F, Reyrolle M, Vandernes F, Etienne J, Farge P** (2001) Different growth rates in amoeba of genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a thermal spa . *Epidemiology and Infection* **126**: 231-239.
- Molmeret M, Wagner M, Santic M & Abu Kwaik Y** (2005) Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:20-28.
- Morton L H G, Greenway DLA** (1998) Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation* **41**: 247-259.
- Muli FW, Struthers JK** (1998) The growth of *Gardnerella vaginalis* and *Lactobacillus acidophilus* in Sorbarod biofilms. *J Med Microbiol* **47**:401-5.
- Muraca P, Stout J E & Yu VL** (1987) Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 447-453.
- Murga et al** (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* **147**:3121-3126.
- N**
- Negron-Alvira A, Perez-Suarez I, Hazen T C** (1988) *Legionella* spp in Puerto Rico Cooling Towers. *Appl and Environ Microbiol* **54**: 2331-2334.
- Neunuebel M, Chen Y, Gaspar A, Backlund P, Yergey A, Machner M** (2011) De-Amylation of the Small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **333**:453-456.
- Neumeister B, Reiff G, Faigle M, Dietz K, Northoff H, Lang F** (2000) Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes . *Applied and Environmental Microbiology* **66**:914---919.
- Nguyen TMN, Ille D, Jarraud S et al.** (2006) A community-wide outbreak of légionnaires disease linked to industrial cooling towers-how far can contaminated aérosols spread? *Journal of Infection Disease* **193**:102-111.
- Noguera DR, Okabe S & Picioreanu C** (1999) Biofilm modeling: Present status and future directions. *Wat Sci Tech* **39**:273-278.

O

- Oguma K, Katayama H, Mitani H, Morita S, Hirata T & Ohgaki S** (2001) Determination of Pyrimidine Dimers in *Escherichia coli* & *Cryptosporidium parvum* during UV Light Inactivation, Photoreactivation, and Dark Repair. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:4630-4637.
- Oliver JD** (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* **43** : 93-100.
- Oliver JD** (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**:415-25.
- O'Neill E, Humphrey H** (2005) Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence? *J Hosp Infect* **59**: 273-279.
- Ophir T & Gutnick DL** (1994) A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 740-74.
- O'Toole GA, Kolter R** (1998a) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**:295-304.
- O'Toole GA, Kolter R** (1998b) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**:449-461.
- O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R** (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**:49-79.
- Sanli-Yurudu N, Kimiran-Erdem A** (2007) Studies on the efficacy of Chloramine T trihydrate (N-chloro-p-toluene sulfonamide) against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **210**: 147-153.
- P**
- Pagnier I, Merchat M, Raoult D, La Scola B** (2009) Emerging *Mycobacteria* spp in cooling towers *Letter Emerg Infect Diseases* **15**: 121-122.
- Patrauchan MA, Florizone C, Dosanjh M, Molm WW, Davies J, Eltis LD** (2005) Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp strain RHA1: redundancies and convergence. *J Bacteriol* **187**:4050-4063.
- Perminova IV, Frimmel FH, Kudryavtsev AV, Kulikova NA, Abbt-Braun G, Hesse S, Petrosyan VS** (2003) Molecular weight characteristics of humic substance from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. *Environmental Science and Technology* **37**:2477-2485.
- Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, Benson RF, Gorman GW** (1984) Whole cell peroxidase test for identification of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* **19**:286-290.
- Piyasena P, E Mohareb E, C McKellar R** (2003) Inactivation of microbes using ultrasound: a review International. *Journal of Food Microbiology* **87**: 207-216.
- Plouffe J F, Para M F & Fuller K A** (1985) Serum bactericidal activity against *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol November* **22**: 863-864.
- Pozos N, Scow K, Wuertz S, Darby J** (2004) UV disinfection in a model distribution system: biofilm growth & microbial community. *Water Research* **38**:3083-3091.
- Pratt LA, Kolter R** (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**:285-293.
- Prevost M, Rompre A, Coallier J, Servais P, Laurent P, Clément B & Lafrance P** (1998) Suspended bacterial biomass activity in full-scale drinking water distribution systems: impact of water treatment. *Water Res* **32**:1393-1406.
- R**
- Ragull S, Garcia-Nunez M, Pedro-Botet M L, Sopena N, Maria Esteve M, Montenegro R & Sabria M** (2007) *Legionella pneumophila* in Cooling Towers: Fluctuations in Counts, Determination of Genetic Variability by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), and Persistence of PFGE Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5382-5384.
- Ramirez JA, Summersgill JT** (1994) Rapid tests for the diagnosis of *Legionella* infections. *J Ky Med Assoc* **92**: 62-65.
- Rand J L, Hofmann R** (2007) A field study evaluation for mitigating biofouling with chlorine dioxide or chlorine integrated with UV disinfection. *Water Research* **41**: 1939-1948.

- Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M & Etienne J (1998) Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR & pulsed-field for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 161-167.
- Riffard S, Douglass S (2001) Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Science and Technology* **43**:99-102.
- Ratcliff R, Lanser J, Manning P, Heuzenroeder M (1998) Sequence-based classification schème for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *Journal of Clinical Microbiology* **36**:1560-1567.
- Ratcliff R, Stephen C, Donnellan SC, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW (1997) Interspecies sequence differences in the Mip protein from the genus *Legionella*: implications for function & evolutionary relatedness. *Molecular Microbiology* **25**: 1149-1158.
- Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Luck PC (2007) Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminase cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 1965-1968.
- Reed D (1998) Selecting alternatives to chlorine disinfection Pollution. *Engineering* **30**:48-51.
- Reeves M, Pine L, Hunter S, George J, Harrell W (1981) Metal requirements of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **13**: 688-695.
- Reingold et al (1984) *Legionella pneumonia* in the United States: the distribution of serogroups and species causing human illness. *Journal of Infectious Diseases* **149**:819.
- Ren D, Sims JJ & Wood TK (2002) Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett Appl Microbiol* **34**:293-9.
- Ribas F, Frías J, Huguet JM & Lucena F (1997) Efficiency of various water treatment processes in the removal of biodegradable and refractory organic matter. *Water Research* **31**:639-649.
- Roberts ME, Stewart PS (2005) Modeling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* **151**:75-80.
- Rochex A, Lebeault JM (2007) Effects of nutrients on biofilm formation & detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine. *Water Res* **41**:2885-92.
- Rochex A, Godon JJ, Bernet N, Escudié R (2008) Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Research* **42**:4915-4922.
- Rodriguez-Zaragoza (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* **20**:225-241.
- Roeder RS, Lenz J, Tarne P, Gebel J, Exner M, Szewzyk U (2010) Long term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms International. *Journal of Hygiene and Environmental Health* **213**: 183-189.
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV & Keevil CW (1994 a) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:1585-1592.
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV & Keevil CW (1994 b) Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:1842-1851.
- Ronner AB, Wong SCL (1993) Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. *J Food Prot* **56**: 750-758.
- Roszak DB, Grimes DJ, Colwell RR (1984) Viable but non reconvertible stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can J Microbiol* **30**: 334-338.
- Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology* **33**:1179-1183.
- Rowbotham TJ (1986) Current views on the relationships between amoebae, *Legionellae* and man. *Israel Journal of Medical Science* **22**:678-689.
- Rubin C, Thollesson M, Kirsebom L, Herrmann B (2005) Phylogenetic relationships and species differentiation of 39 *Legionella* species by sequence determination of the RNase P RNA gene *rnpB*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:2039-2049.
- Ruiz M et al 1999 Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity American Journal of Respiratory Critical Care. *Medicin* **160**:397-405.

S

- Saby S, Vidal A & Suty H** (2005) Resistance of *Legionella* to disinfection in hot water distribution systems *Water. Science and Technology* **52** (8): 15-28.
- Samrakandi MM, Roques C, Michel G** (1997) Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Can J Microbiol* **43**:751-8.
- Sarathy SR, Mohseni M** (2010) Effects of UV/H₂O₂ advanced oxidation on chemical characteristics and chlorine reactivity of surface water natural organic matter. *Water Research* **44**: 4087-4096.
- Sarathy SR, Mohseni M** (2009) The fate of natural organic matter during UV/H₂O₂ advanced oxidation of drinking water. *Canadian Journal of Civil Engineering* **36**: 160-169.
- Sarathy SR, Mohseni M** (2007) The impact of UV/H₂O₂ advanced oxidation on molecular size distribution of chromophoric natural organic matter. *Environmental Science and Technology* **41** : 8315-8320.
- Sarathy SR, Mohseni M** (2006) An overview of UV-based advanced oxidation processes for drinking water treatment. *IUVA News* **8**, 16-27.
- Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LAH, Davies DG & Gilbert P** (2004) Characterization of Nutrient Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J Bacteriol* **186**:7312-7326.
- Sawyer LK & Hermanowicz SW** (2000) Detachment of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa* due to Variations in Nutrient Supply. *Water Sci Technol* **41**: 139-145.
- Schulte S, Wingender J & Flemming HC** (2004) Efficacy of biocides against biofilms In: Directory of Microbicides for the Protection of Materials. Wilfried Paulus (ed), Springer Netherlands: 93-120.
- Schuster FL, Visvesvara GS** (2004) Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology* **126**: 91-120.
- Servais P, Billen G Hascoet MC** (1987) Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Research* **21**: 445-50.
- Servais P** (1989) Bacterioplankton biomass and production in the river Meuse (Belgium). *Hydrobiologia* **774**:899-110.
- Servais P, Billen G, Laurent P, Levi Y & Randon G** (1993) Bacterial regrowth in distribution systems Proceedings AWWAWQTC Conference, Miami, FL, 7-10 November, 1993.
- Shang C, Cheung LM, Chiu-Man Ho, Zeng M** (2009) Repression of photoreactivation and dark repair of coliform bacteria by TiO₂-modified UV-C disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental* **89**:536-542.
- Sharon N** (2006) Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**: 527-537.
- Sies H** (1993) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res* **299**:183-191
- Sies H, Menck CF** (1992) Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res* **275**:367-375
- Simoës M, Simoës LC, Vieira MJ** (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* **43**:573-583.
- Simoës M, Simoës LC, Vieira MJ** (2009) Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research* **43**: 229-237.
- Simoës LC, Simoës M, Vieira MJ** (2007) Biofilm Interactions between Distinct Bacterial Genera Isolated from Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 6192-6200.
- Skaliy P, Thompson TA, Gorman GW, Morris GK, McEachern HV, Mackel DC** (1980) Laboratory studies of disinfectants against *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **40**:697-700.
- Smith VH** (2007) Microbial diversity-productivity relationships in aquatic ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* **62**:181-186.
- Smith JL, Fratamico PM & Novak JS** (2004) Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *J Food Prot* **67**:1053-1070.
- Soderberg MA, Rossier O, Cianciotto NP** (2004) The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology* **186**:3712-3.
- Sommer R, Lhotsky M, Haider Y, Cabaj A** (2000) UV Inactivation, Liquid-Holding Recovery, and Photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and Other Pathogenic *Escherichia coli* Strains in Water. *Journal of Food Protection* **63**: 1015-1020.
- Spoering AL, Vulic M, Lewis K** (2006) GlpD and PlsB Participate in Persister Cell Formation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **188**: 5136-5144.

- Srikanth S & Berk SG** (1993) Stimulatory Effect of Cooling Tower Biocides on Amoebae. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3245-3249.
- Stanislawiak RU, Swietlik J, Dabrowska A, & Nawrocki J** (2004) Biodegradability of organic by-products after natural organic matter oxidation with ClO₂ - case study. *Water Res* **38**:1044-1054.
- Starkenburg S, Casey J, Cianciotto N** (2004) Siderophore activity among *Legionella* genus. *Curr Microbiol* **49**: 203-207.
- States SJ, Conley LF, Ceraso M, et al.** (1985) Effects of Metals on *Legionella pneumophila* Growth in Drinking Water Plumbing Systems. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1149-1154.
- Steele TW, McLennan AM** (1996) Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. *Appl Environ Microbiol* **62**:1081-3.
- Steele TW, Lanser J & Sangste N** (1990) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Appl Environ Microbiol* **56**: 49-53.
- Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberg C, Glöckner G** (2007) *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol* **297**:577-587.
- Steinert M, Hentschel U & Hacker J** (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *Microbiol Rev* **26**:149-162.
- Steinert M, Emody L, Amann R & Hacker J** (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **63**:2047-2053.
- Stewart PS, Roe F, Rayner J, Elkins JG, Lewandowski Z, Ochsner UA & Hasset DJ** (1999) Effect of Catalase on Hydrogen Peroxide Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms . *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 836-838.
- Stewart PS** (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* **292**:107-113.
- Stone B, Kwaik A** (1999) Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *Journal of Bacteriology* **181**:1395-1402.
- Storey MV, Langmark J, Ashbolt NJ, Stenstrom TA** (2004) The fate of *Legionellae* within distribution pipe biofilms: Measurement of their persistence, inactivation, and detachment. *Water Sci Tech* **49**:269-275
- Stout JE, Yu VL** (1997) Legionellosis New England. *Journal of Medicine* **337**:682-687.
- Surette MG, Miller MB & Bassler BL** (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for 281 autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:1639-1644.
- Surman S, Morton G, Keevil B & Fitzgeorge RB** (2002) *Legionella pneumophila* proliferation is not dependent on intracellular replication, p 86-89 In R Marre, Y Abu Kwaik, C Bartlett, N P Cianciotto, B S Fields, M Frosch, J Hacker, and P C Luck (ed), *Legionella* ASM Press, Washington, DC.
- Sutherland IW** (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**:3-9.
- Swietlik J, Dabrowska A, Raczek-Stanislawiak U, Nawrocki J** (2004) Reactivity of natural organic matter fractions with chlorine dioxide and ozone. *Water Research* **38**:547-558.
- T**
- Tanji Y, Nishihara T, Miyanaga K** (2007) Monitoring of biofilm in cooling water system by measuring lactic acid consumption rate. *Biochemical Engineering Journal* **35**: 81-86.
- Terzaghi B E, & W Sandine** (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* **29**:807-813.
- Thacker WL, Wilkinson HW, Benson RF, Brenner D** (1987) *Legionella pneumophila* serogroup 12 isolated from human and environmental sources. *Journal of Clinical Microbiology* **5**:569-570.
- Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Levi Y** (2004) Amoeba in domestic water systems : resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* **97**: 950-963.
- Thomas W M, Eccles J & Fricker C** (1999) Laboratory observations of biocide efficiency against *Legionella* in model cooling tower systems.
- Tolker-Nielsen T, & Molin S** (2000) Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol* **40**:75-84.
- Triassi M, Di Popolo A, Ribera D'Alcala G, Albanese Z, Cuccurullo S, Montegrosso S, Crispino M, Borella P, Zarrilli R** (2006) Clinical and environmental distribution of *Legionella pneumophila* in a university hospital in Italy: efficacy of ultraviolet disinfection. *Journal of Hospital Infection* **62**: 494-501.

- Trinetta V, Vaid R, Xu Q, Linton R, Morgan M** (2012) Inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat food processing equipment by chlorine dioxide gas. *Food Control* **26**:357-362.
- Turetgen I** (2004) Comparison of free residual chlorine and monochloramine for efficacy against biofilms in model and full scale cooling towers. *Biofouling* **20**:81-85.
- Turetgen I** (2008) Induction of Viable but Nonculturable (VBNC) state and the effect of multiple subculturing on the survival of *Legionella pneumophila* strains in the presence of monochloramine. *Annals of Microbiology* **58** : 153-156.
- V**
- van der Kooij D** (1982) Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J Am Water Works Assoc* **84**:57-65.
- van Houdt R, Michiels CW** (2005) Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research Microbiol* **156**:626-33.
- van Wijk DJ, Hutchinson TH** (1995) The ecotoxicity of chlorate to aquatic organisms: a critical review. *Ecotoxicol. Environ Saf* **32**:244-53.
- van Wijk DJ, Kroon SG, Garttner-Arends IC** (1998) Toxicity of chlorate and chlorite to selected species of algae, bacteria, and fungi. *Ecotoxicol. Environ Saf* **40**:206-11.
- Velimirov B** (1994) Carbon fluxes in the microbial loop: Comments. *Microbiol Ecol* **28**: 205-207.
- Venczel L V, Arrowood M** (1997) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1598-1601.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J & Michiels J** (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology* **16**: 496-506.
- Veschetti E, Cittadini B, Maresca D, Citti G, Ottaviani M** (2005) Inorganic by-products in waters disinfected with chlorine dioxide. *Microchem J* **79**: 165.
- Vickers RM, Stout JE, Tompkins LS, Troup NJ, Yu VL** (1992) Cefamandole-susceptible strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1: Implications for diagnosis and utility as an epidemiological marker. *J Clin Microbiol* **30**: 537-539.
- Viera MR, Guimet P S, de Mele MFL & Videla HA** (1999) Use of dissolved ozone for controlling planktonic and sessile bacteria in industrial cooling systems. *International Biodeterioration and Biodegradation* **44**: 201-207.
- Vilhunen S, Vilve M, Vepsäläinen M, & Sillanpää M** (2010) Removal of organic matter from a variety of water matrices by UV photolysis and UV/H₂O₂ method. *J Hazard Mater* **15**:776-782.
- Visick KL & C Fuqua** (2005) Decoding microbial chatter: Cell-cell communication in bacteria. *J Bacteriol* **187**:5507-5519.
- Vogel JP, Isberg RR** (1999) Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Current Opinions in Microbiology* **2**:30-34.
- Volk CJ, Hofmann R, Chauret C, Gagnon GA, Ranger G & Andrews RC** (2002) Implementation of chlorine dioxide disinfection: Effects of the treatment change on drinking water quality in a full-scale distribution system. *Journal of Environmental Engineering and Science* **1**: 323-330.
- W**
- Wadowsky RM, Yee RB** (1981) Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 768-772.
- Wadowsky RM, Wilson TM, Kapp N J, West A J, Kuchta J M, Qtates S J, Dowling J N & Yee R B** (1991) Multiplication of *Legionella* spp in Tap Water Containing *Hartmannella vermiformis*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1950-1955.
- Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS** (2003) Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** : 317-323.
- Wang Y, Claeys L, van der Ha D, Verstraete W & Boon N** (2010) Effects of chemically and electrochemically dosed chlorine on *Escherichia coli* and *Legionella beliardensis* assessed by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**:331-341.
- Wang GS, Liao CH, Chen HW & Yang HC** (2006) Characteristics of Natural Organic Matter degradation in Water by UV/H₂O₂ Treatment. *Environmental Technology* **27**: 277-287.

- Wang GS Hsieh ST & Hong CS** (2000) destruction of humic acid in water by UV light catalyzed oxidation with hydrogen peroxide. *Water Research* **34**: 3882-3887.
- Watnick PI, Kolter R** (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* **34**:586-595.
- Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R** (2001) The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* **39**:223-235.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC & Mattick JS** (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
- Wingender J, Neu TR, Flemming HC** (1999) Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structures and Function. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg Chapter 3: 1-20.
- Werdehoff KS & Singer PC** (1987) Chlorine Dioxide Effects on THMFP, TOXFP, and the Formation of Inorganic By-products. *Journal American Water Works Association* **79**:107-113.
- Wery N, Bru-Adan V, Minervini C, Delgenes JP, Garrelly L & Godon JJ** (2008) Dynamics of *Legionella* spp and Bacterial Populations during the Proliferation of *L. pneumophila* in a Cooling Tower Facility. *Applied and environmental microbiology* **74**: 3030-3037.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ & Salmond GP** (2001) Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**:365-404.
- Wimpenny JWT & Colasanti R** (1997) A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automation models. *FEMS Microbiology Ecology* **22**: 1-16.
- Witt V, Wild C & Uthicke S (2011)** Effect of substrate type on bacterial community composition in biofilms from the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiology Letters* **323**: 188-195.
- X**
- Xavier KB & Bassler BL** (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 191-197.
- Xu H, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ & Colwell RR** (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* **8**: 313-323.
- Y**
- Yamamoto H, Sugiura M, Kusunoki S, Ezaki T, Ikedo M & Yabuuchi E** (1992) Factors Stimulating Propagation of *Legionellae* in Cooling Tower Water. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1394-1397.
- Yong F Y, Tan SH, Wee J, Tee JJ, Sansom F M, Newton HJ and Hartland E L** (2010) Molecular detection of *Legionella*: moving on from *mip*. *Frontiers in microbiology* **1**:1-5.
- Z**
- Zimmer JL, Slawson RM & Huck PM** (2007) A comparison of DNA repair and survival of *Escherichia coli* O157:H7 following exposure to both low- and medium-pressure UV irradiation. *Journal of Water and Health* **05**: 407-415.
- Zimmer JL, Slawson RM, Huck PM** (2003) Inactivation and potential repair of *Cryptosporidium parvum* following low- and medium-pressure ultraviolet irradiation. *Water Research* **37**: 3517-3523.

X- Annexes

X Annexes

X.1 Annexe 1 : liste des figures

Figure 1 : Schéma d'une tour ouverte (tour à échange direct). (1) répartiteurs, (2) 'packing', (3) bassin incliné, (4) dispositif pare gouttelettes.	18
Figure 2 : Structure d'un biofilm au cours des différentes phases de son développement (Center for Biofilm Engineering 2003).	22
Figure 3 : processus de formation des biofilms (Simoes et al., 2010)	24
Figure 4 : Cellule d'E. coli vue au microscope électronique, entourée de ses pilis (Sharon N. 2006. Biochim. Biophys. Elsevier Acta 1760: 527–537).....	25
Figure 5 : Images reconstituées de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 observés au microscope laser confocal montrant le développement en groupes des différentes composantes des communautés bactériennes. Les images rectangulaires qui bordent les images carrées sont celles du biofilm vu en coupe.	27
Figure 6 : Photo au microscope électronique à balayage montrant les nanocables qui relient entre elles les bactéries d'un biofilm. Jeff McLean (PNNL), Orianna Bretchger (USC) and Bruce Arey (PNNL).	27
Figure 7. Cycle de développement d'un biofilm (prometheus.mse.uiuc.edu). 1 Colonisation de la surface, accrochage réversible 2 Production d'EPS, accrochage irréversible, 3 et 4 Phase de structuration et de maturation 5 Phase de décrochage passif et actif.	28
Figure 8 : Implication de la fraction de bactéries dite « Persisters » dans la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens selon Drenkard (Drenkard et al., 2003)	33
Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la résistance des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> aux molécules antimicrobiennes (Drenkard et al., 2003)	36
Figure 10 Forme bâtonnet et forme filamenteuse de <i>L. pneumophila</i> marquées par immunofluorescence.	40
Figure 11 : Arbre phylogénétique résultant d'une analyse de Bayes combinant les données de trois types de séquences (<i>rnpB</i> , <i>mip</i> et ARN 16S) de 55 souches du genre <i>Legionella</i> (Ratcliff et al., 1998)	42
Figure 12 : Diagramme montrant le cœur du génome et les gènes spécifiques aux souches Paris, Lens, Philadelphia, Corby et Alcoy.	44
Figure 13 : Cycle de <i>Legionella pneumophila</i> dans une cellule eucaryote (d'après de Felipe et al., 2008).	49
Figure 14 : Cycle cellulaire de <i>L. pneumophila</i> dans les amibes et les macrophages humains (d'après Fields et al., 2002).....	49
Figure 15 : Infection d' <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (B, D, F) et le macrophage U937 (A, C, E) par <i>L. pneumophila</i> . Phagocytose (A et B) ; formation du réticulum endoplasmique (RER) entourant le phagosome (C et D) ; dernier stage de l'infection (E et F). Photos prise à l'aide de microscope électronique (Bitar et al., 2004).	50
Figure 16 : Système de sécrétion Dot/Icm de <i>L. pneumophila</i> (Isberg et al., 2009)	52
Figure 17 : Schéma des étapes de la multiplication intracellulaire de <i>L. pneumophila</i> dans les macrophages et les protéines impliquées ou potentiellement impliquées dans le processus infectieux (Bruggemann et al., 2006).	54
Figure 18 : Photos prises à l'aide d'un microscope à contraste interférentiel (1,2), (1) Trophozoites d' <i>Acanthamoeba</i> . La flèche désigne la projection de pseudopodes caractéristiques appelés acanthopodes (V) vacuoles (N) Noyau. (2) Kystes d' <i>A. comandoni</i> , la membrane du kyste est constituée de deux couches : endocyste (I) et ectocyste (O). Les Pores (ostioles) sont localisés à la jonction des deux couches (Flèches) (Schuster et al., 2004). (3) Kyste d' <i>Acanthamoeba</i> observé par microscopie optique montrant l'ectocyste (ecc) et l'endocyste (ecc) (Init et al., 2010).	56
Figure 19 : Observation microscopique (microscope optique) des souches de <i>Hartmannella vermiformis</i> isolé de poisson (1 et 2) Trophozoites (3, 4) Kystes mature (Dykova et al., 2005).	56
Figure 20 : Observation morphologique de <i>Negleria</i> en microscopie optique (1) Trophozoites montrant l'éruption des pseudopodes typiques appelés « Lobopodes » (ep) (2) Kyste montrant les deux couches membranaires : ectocyste (ecc) l'endocyste (enc) (Init et al., 2010) (3) Formation de flagelles chez <i>N. fowleri</i> marqué par la trichrome, l'amibe est sous forme ovale, possède parfois jusqu'à 4 flagelles polaires. Le noyau est situé au pôle de l'amibe en étroite association avec le corps basal du flagelle (Schuster et al., 2004).	57
Figure 21 : Photo d'une vésicule d' <i>A. castellanii</i> prise par au microscope électronique à transmission.	58
Figure 22. Chambre pour dénombrement de protistes selon Utermöhl (1958)	67
Figure 23 : Spectre d'absorption de l'ADN	69
Figure 24 : Source 'Soufre' d'Aix Les Bains, les lames de verres sont placées dans un support en PVC puis immergées dans l'eau de la source. Elles sont incubées pendant 15 jours (essais PEROX) ou 10 jours (essais SECUROX), puis transportés au laboratoire dans des glacières sous une atmosphère humide obtenue par le dépôt d'eau de la source (35°C environ) au fond de la glacière.....	83

Liste des figures

Figure 25 : Schéma d'un incubateur biologique (A) et d'un banc de 3 réacteurs biologiques (B)	84
Figure 26 : Schéma du dispositif expérimental des essais PEROX.....	85
Figure 27 : Photos de l'installation expérimentale utilisée pour les essais PEROX.....	85
Figure 28 : Schéma récapitulatif de la procédure expérimentale pour l'étude de l'efficacité des traitements PEROX.....	87
Figure 29 : Caractéristiques des quatre phases des études expérimentales du traitement SECUROX.....	88
Figure 30 : Schéma du dispositif expérimental des essais SECUROX (→ injection continue, → injection discontinue)	89
Figure 31. Disposition des bancs de réacteurs biologiques (un banc "témoin" et deux bancs "essai", pour chacune des expériences).	90
Figure 32 : Dispositif de fixation d'une lampe UV et des supports artificiels pour l'étude de la croissance des biofilms dans les tours aéro-réfrigérantes.	95
Figure 33 : Dispositif d'échantillonnage des substrats en place (A). La photo (B) montre l'empreinte laissée par l'échantillonneur après le prélèvement des biofilms sur le fond du bassin froid d'une TAR.	96
Figure 34 : Disposition des lames dans les tubes d'accrochage des supports artificiels dans les tours aéro-réfrigérantes (A) accrochage de 3 tubes contenant chacun une lame de verre. (B) accrochage des supports à l'aide d'un fil permettant l'immersion des supports dans la bêche de la tour.....	97
Figure 35 : Disposition des lames de verre dans des tubes accrochés à un support métallique pour leur maintien dans le fond de la bêche.....	97
Figure 36 : Schéma récapitulatif de la préparation des solutions de matières organiques utilisées au cours de l'essai 1	100
Figure 37 : Schéma expérimental de l'essai 1	101
Figure 38 : Schéma récapitulatif de la préparation des solutions d'acides humiques au cours de l'essai 2	102
Figure 39 : Schéma expérimental de l'essai 2	103
Figure 40 : Schéma récapitulatif de la préparation des solutions d'acides humiques/tryptone au cours de l'essai 3	104
Figure 41 : Schéma expérimental de l'essai 3	105
Figure 42 : Procédure de traitement des solutions de matières organiques par le couple H ₂ O ₂ /UV	106
Figure 43 : Dispositif de traitement par les UV des solutions de matières organiques	106
Figure 44 : Schéma de la procédure expérimentale du traitement UV	115
Figure 45 : Schéma de la procédure expérimentale du traitement H ₂ O ₂ /UV.....	116
Figure 46 : Séparation immuno magnétique des légionelles (source : Invitrogen)	120
Figure 47 : Résultats de l'amplification du gène ARNr16S	128
Figure 48 : Résultats de l'amplification du gène lpg1905	128
Figure 49 : Résultats de l'amplification du gène lpg0774	129
Figure 50 : Résultats de l'amplification des gènes mip et wzm en multiplex PCR.....	129
Figure 51 : Résultats de l'amplification des gènes 16s, mip et wzm chez les souches LAXA53 et 54.....	132
Figure 52 : Dendogramme représentant les relations entre 31 isolats environnementaux de la source soufre et des isolats cliniques <i>L. pneumophila</i> sg1. Les profils de l'ADN bactérien total sont obtenus après PFGE et sont normalisés à l'aide du logiciel GelComparII.	133
Figure 53 : Alignement des séquences mip1, mip2 et mip3	134
Figure 54 : Relations entre pulsotypes, sérogroupes et séquences mip	135
Figure 55 : Arbre phylogénétique des séquences mip1, mip2, mip3 et des séquences mip d'isolats cliniques de légionelles (réalisé à l'aide du logiciel MEGA 5).....	137
Figure 56 : Exemple de résultats d'un Plate test, les photos des boîtes de Pétri ont été prise après 7 jours d'incubation.	139
Figure 57 : Résultats du « Plate test » des souches environnementales isolées de la source « Soufre » et des souches cliniques du sg 1	139
Figure 58: Photos de boîte de Pétri montrant les colonies des légionellesensemencées à partir des puits contenant les amibes d' <i>A. castellanii</i> infectées	140
Figure 59 : Photo des puits contenant un tapis d' <i>A. castellanii</i> : (A) non infectée, (B) infectée par le mutant dotA, (C) infectée par la souche Lp1 Lens et (D) infectée par la souche environnementale LAXB8 (Lp1)	141
Figure 60 : Estimation des légionelles extracellulaires après 24 h et 48 h d'infection d' <i>A. castellanii</i>	141
Figure 61 : Estimation des légionelles extracellulaires après 24 h (colonnes bleues) et 48 h (colonnes rouges) d'infection d' <i>A. castellanii</i> . (A) selon le sg des isolats et la campagne de prélèvement (B) selon les classes d'isolats (sg, séquences mip, et PST)	142
Figure 62 : Cytotoxicité des légionelles vis-à-vis de l'amibe <i>A. castellanii</i> après 24 h (colonnes bleues) et 48 h (colonnes rouges) d'infection. (A) selon le sg des isolats et la campagne de prélèvement (B) selon les classes d'isolats (sg, séquences mip, et PST).....	143
Figure 63 : Cinétique de dégradation de l'H ₂ O ₂ dans les différentes variantes du milieu BYE	145
Figure 64 : Abattements des concentrations des Lp observés après 24 h d'incubation dans les variantes du milieu BYE	145

Liste des figures

Figure 65 : Cinétiques de dégradation de l'H ₂ O ₂ à 10 ppm en absence (courbes continues) et en présence (courbe en pointillés) des UV	146
Figure 66 : Effet de l'H ₂ O ₂ à 5 ppm (courbes bleues), des UV (courbes vertes) et de l'H ₂ O ₂ (5 ppm)/UV (courbes rouges) sur l'inactivation des souches environnementales de <i>L. pneumophila</i> sg 1 dans le milieu BYE sans pyrophosphate de fer III dilué au 1/10 : (A) souche LAXB6, (B) souche LAXB8, (C) souche LAXB22, (D) souche LAXB24. Les points et les barres d'erreurs représentent les moyennes et les écarts types de 4 mesures réalisées dans deux expériences indépendantes.	147
Figure 67 : Effet de l'H ₂ O ₂ à 5 ppm (courbes rouge), à 10 ppm (courbes vertes) et de 20 ppm (courbe bleues) sur l'inactivation des souches environnementales de <i>L. pneumophila</i> sg 1 dans le milieu BYE sans Pyrophosphate de fer III dilué au 1/10 : (A) souche LAXB6, (B) souche LAXB8, (C) souche LAXB22, (D) souche LAXB24. Les points et les barres d'erreurs représentent les moyennes et les écarts types de 4 mesures réalisées dans deux expériences indépendantes.	148
Figure 68 : Cytotoxicité des souches LAXB8 (A), LAXB24 (B) traitée et non traitée, de la souche clinique <i>L. pneumophila</i> Lens et du mutant dotA vis-à-vis de l'amibe <i>A. castellanii</i> . Les points et les barres représentent respectivement les moyennes et les écarts types calculés à partir de deux essais indépendants, les mesures sont réalisées en triplicat à chaque essai.	149
Figure 69 : Gel d'électrophorèse montrant les produit PCR des gènes wzm et wzt après migration.....	150
Figure 70 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm ²) après le transfert des biofilms dans les réacteurs biologiques associés à un réservoir d'eau de 20 litres (courbe bleue) et de 100 litres (courbe rouge)	159
Figure 71 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log ₁₀ UFC/cm ²) après le transfert des biofilms dans les réacteurs biologiques associés à un réservoir d'eau de 20 litres (courbe bleue) et de 100 litres (courbe rouge).....	159
Figure 72 : Evolution des concentrations des bactéries totales (Log ₁₀ bactéries /cm ²) après le transfert des biofilms dans les réacteurs biologiques associés à un réservoir d'eau de 20 litres (courbe bleue) et de 100 litres (courbe rouge).....	160
Figure 73 : Schéma récapitulatif des principales conditions d'incubation des biofilms dans le dispositif expérimental et leurs effets sur les biofilms (A : modifications constatées, B : modifications probables).....	160
Figure 74 : Cinétiques de dégradation de l'H ₂ O ₂ (A) à 10, 30 et à 50 ppm dans de l'eau brute (B) à 30 et 50 ppm dans de l'eau brute et dans de l'eau supplémentée de matière organique. (MO : matière organique à 3 ppm de COD).....	162
Figure 75 : Evolution des concentrations (courbes continues) et des flux de l'H ₂ O ₂ (courbes discontinues) observés pendant les essais de traitement à l'H ₂ O ₂ seul à des concentrations de 30 (courbes rouges) et de 50 ppm (courbes bleues).	164
Figure 76 : Flux (A) et concentrations (B) de l'H ₂ O ₂ observés pendant les essais de traitement à l'H ₂ O ₂ à des concentrations de 10, 30 et de 50 ppm couplé aux UV.	165
Figure 77 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm ²) (A), des bactéries cultivables (Log ₁₀ UFC /cm ²) (B), et des bactéries totales (Log ₁₀ bactéries totales /cm ²) (C) dans les biofilms de référence (courbes rouges) et les biofilms traités aux UV (courbes vertes). Courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II.	168
Figure 78 : Evolution des concentrations de <i>Lp</i> cultivables (Log ₁₀ UFC/cm ²) (A) et totales (Log ₁₀ N/cm ²) (B) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et traités aux UV (courbes vertes). Courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II.	169
Figure 79 : Evolution des concentrations d'amibes (Amibes/cm ²) dans les biofilms non traités (courbe rouge) et traités aux UV (courbe verte). Courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II.....	169
Figure 80 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm ²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes). (A) : 30 ppm d'H ₂ O ₂ (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d'H ₂ O ₂	170
Figure 81 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log ₁₀ UFC/cm ²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes) (A) : 30 ppm d'H ₂ O ₂ (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d'H ₂ O ₂	171
Figure 82 : Evolution des concentrations des bactéries totales (Log ₁₀ N/cm ²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes). (A) : 30 ppm d'H ₂ O ₂ (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d'H ₂ O ₂	172
Figure 83: Evolution des concentrations des <i>Lp</i> cultivables (Log ₁₀ UFC/cm ²) dans les biofilms non traités (carrés rouges) et dans les biofilms traités (carrés verts) au cours d'un traitement à 50 ppm d'H ₂ O ₂	172
Figure 84 : Evolution des concentrations de <i>Lp</i> totales (Log ₁₀ N/cm ²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes). (A) : 30 ppm d'H ₂ O ₂ (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d'H ₂ O ₂	173
Figure 85 : Evolution des concentrations des amibes (amibes/cm ²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités (courbes vertes). (A) : 30 ppm d'H ₂ O ₂ (courbes continues : expérience I, courbes discontinues : expérience II) et (B) 50 ppm d'H ₂ O ₂	174

Figure 86 : Evolution des concentrations d'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités par le couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; ordonnées à gauche, courbes discontinues : expérience II, ordonnées à droite) et (C) 50 ppm d'H₂O₂. 175

Figure 87 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités au couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d'H₂O₂. 176

Figure 88 : Evolution des concentrations des bactéries totales (Log₁₀ N/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités par le couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d'H₂O₂. 177

Figure 89 : Evolution des concentrations des *L. pneumophila* cultivables (Log₁₀ UFC/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités au couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d'H₂O₂. 178

Figure 90 : Evolution des concentrations des *L. pneumophila* totales (Log₁₀ Lp/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités au couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d'H₂O₂. 179

Figure 91 : Evolution des concentrations des amibes (Amibes/cm²) dans les biofilms non traités (courbes rouges) et dans les biofilms traités au couple H₂O₂/UV (courbes vertes). (A) : 10 ppm d'H₂O₂, (B) : 30 ppm d'H₂O₂ (courbes continues : expérience I ; courbes discontinues : expérience II) et (C) 50 ppm d'H₂O₂. 180

Figure 92 : Evolution des concentrations de l'ATP (A), des bactéries cultivables (B) et des bactéries totales (C) dans le biofilm (pmol/cm²) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau (pmol/ml) (contrôle : courbe rouge essai : courbe verte) au cours d'un traitement aux UV 182

Figure 93 : Evolution des concentrations de l'ATP (A), des bactéries cultivables (B) et des bactéries totales (C) dans le biofilm (/cm²) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau (/ml) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) sous l'effet d'un traitement à l'H₂O₂ à 30 ppm. 184

Figure 94 : Evolution des concentrations de l'ATP dans le biofilm (pmol/cm²) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau (pmol/ml) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) au cours d'un traitement au couple H₂O₂/UV à 10 ppm (A) et 30 ppm d'H₂O₂ (B) 185

Figure 95 : Evolution des concentrations des bactéries totales dans les biofilms (Log₁₀ UFC/cm²) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau (Log₁₀ UFC/ml) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) au cours d'un traitement au couple H₂O₂/UV à 10 ppm (A) et 30 ppm (B) d'H₂O₂. 186

Figure 96 : Evolution des concentrations des bactéries totales dans les biofilms (Log₁₀ N/cm²) (contrôle : courbe bleue, essai : courbe noire) et dans l'eau (Log₁₀ N/ml) (contrôle : courbe rouge, essai : courbe verte) au cours d'un traitement au couple H₂O₂/UV à 10 ppm (A) et 30 ppm (B) d'H₂O₂. 187

Figure 97 : Evolution des proportions Et/Tt (valeurs standardisées) de l'ATP (A), des bactéries cultivables (B) et des bactéries totales (C) lors des traitements à 30 ppm (courbes rouges) et à 50 ppm (courbes vertes) d'H₂O₂. 191

Figure 98 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin, lors des traitements à 30 ppm (courbes rouges) et 50 ppm (courbes vertes) d'H₂O₂. 193

Figure 99 : Evolution des proportions de *L. pneumophila* totales (A) et des amibes (B) sous l'effet des traitements H₂O₂ et H₂O₂/UV à 30 et à 50 ppm d'H₂O₂. 195

Figure 100 : Estimation des pourcentages des bactéries cultivables possédant une activité catalase par un test catalase in situ sur les colonies bactériennes développées sur le milieu TSA lors d'essais de traitements à 30 ppm d'H₂O₂. Les points et les barres d'erreurs représentent les moyennes et les écarts types des mesures effectuées lors de deux essais indépendants (3 mesures par essai à chaque prélèvement). 198

Figure 101 : A, B, C : Cinétique de dégradation de l'H₂O₂ après un traitement à l'H₂O₂ à 30 ppm, les cinétiques sont réalisées à des concentrations initiales d'H₂O₂ de 30 ppm (A) 50 ppm (B) et 100 ppm (C). D : Cinétique de dégradation de l'H₂O₂ après un traitement à l'H₂O₂ (10 ppm)/UV à une concentration initiale de 50 ppm. Circuit de référence (non traité) : courbes bleues et circuit traité : courbes rouges. 199

Figure 102 : Evolution des concentrations de COD et du COT lors des traitements à l'H₂O₂ à 30 ppm (A) et à 50 ppm (B). (Ajout MO= Ajout de matière organique) 201

Figure 103 : Evolution des concentrations de COD et du COT lors d'un traitement aux UV. 201

Figure 104 : Evolution des concentrations du COD et du COT au cours d'un traitement par le couple H₂O₂/UV à des concentrations de 10 ppm (A), 30 ppm (B) et 50 ppm (C) d'H₂O₂. 203

Figure 105 : Evolution simultanée des flux, de la concentration d'H₂O₂ et des concentrations du COD et du COT lors du traitement à 10 ppm d'H₂O₂/UV 204

Figure 106 : Concentrations de COD (colonnes bleues) de COT (colonnes rouges) des solutions de matière organiques : (A) solution de tryptone, (B) solution d'acides humiques, (C) mélange acides humiques tryptone. 205

Figure 107 : Concentrations du COD des 3 solutions, (A) solution de tryptone, (B) solution d'acides humiques, (C) mélange acide humique-tryptone) à J0 (colonnes bleues), J30 (colonnes rouges) et J35 (colonnes verte). 207

Liste des figures

Figure 108 : Evolution des concentrations de carbone organique dissous biodégradable (CODB) d'une solution de tryptone sous l'effet de 3 traitements biocides.....	208
Figure 109 : Caractérisation des solutions d'acides humiques : (A) concentrations du COT et du COD et (B) pourcentages de COD des solutions d'acides humiques.	210
Figure 110 : (A) Concentrations du COD et (B) du COT des solutions d'acides humiques filtrée et standard en fonction de la durée d'exposition aux traitements H_2O_2 (50ppm)/ UV_{254nm}	211
Figure 111 : Evolution des concentrations en COD : (A) des solutions standards, (B) des solutions filtrées	212
Figure 112 : Concentrations en CODB de la solution d'acides humiques filtrée non traitée à J30 et J35.....	213
Figure 113 : Schéma représentatif de l'action du traitement H_2O_2/UV sur les fractions biodégradable et réfractaire du COD de la solution d'acides humiques filtrée.....	214
Figure 114 : Concentrations du COD et du COT (A) et pourcentage du COD (B) dans les solutions de matières organiques standard et filtrée.	215
Figure 115 : Profils moléculaires de la solution standard de matières organiques non traitée. (A) spectre UV à 254 nm, (B) spectre de fluorescence Ex330-Em440 nm et (C) Ex280-Em330 nm.....	219
Figure 116 : Profils moléculaires des solutions de matières organiques (courbes rouges : solution témoin, courbes bleues : solution traitée pendant 1h, courbes vertes : solutions traitées pendant 6h), (A) : spectre UV (254 nm), (B) : spectre de fluorescence Ex330-Em440 nm et (C) Ex280-Em330 nm.	220
Figure 117 : Profils moléculaires des solutions de matières organiques (courbes rouges : solution témoin, courbes bleues : solution traitée pendant 1h, courbes vertes : solutions traitées pendant 6h), (A) :spectre UV (254 nm), (B) : spectre de fluorescence Ex330-Em440 nm et (C) Ex280-Em330 nm.	221
Figure 118 : Profils moléculaires des solutions de matières organiques (courbes rouges : solution témoin, courbes bleues : solution traitée pendant 1h, courbes vertes : solutions traitées pendant 6h), (A) : spectre UV (254 nm), (B) : spectre de fluorescence Ex330-Em440 nm et (C) Ex280-Em330 nm.	222
Figure 119 : Bioluminescence de <i>V.fischeri</i> incubée pendant 15 min dans des solutions de matière organique non traitées et traitée par l' H_2O_2 et par les UV appliqués isolément et par le couple H_2O_2/UV ,. A : solutions filtrées, B : solutions standards.	223
Figure 120 : Evolution des concentrations de l'ATP ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) (A), des bactéries cultivables (Log_{10} UFC cm^2) (B) des bactéries totales (Log_{10} N cm^2) (C) et des amibes (Amibes/ cm^2) au cours de la phase d'adaptation des biofilms. Les points et Les barres d'erreurs représentent les moyennes et les écarts type de trois mesures.	234
Figure 121 : Schéma récapitulatif de la procédure expérimentale de l'étude de l'efficacité du traitement SECUROX.	234
Figure 122 : Evolution de la concentration du ClO_2 dans le circuit recevant un traitement discontinu (10 mg/jour, courbe verte) et dans celui qui était traité en continu (0,1 ppm de ClO_2 , courbe rouge). Les losanges bleus représentent les heures d'injection de ClO_2 du traitement discontinu.....	236
Figure 123 : Evolution des concentrations d'ATP ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.	237
Figure 124 : Evolution des concentrations de bactéries cultivables (Log_{10} UFC/ cm^2) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.	239
Figure 125 : Evolution des concentrations de bactéries totales ($\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.....	240
Figure 126 : Evolution des concentrations de <i>L. pneumophila</i> totales (Log_{10} Lp/ cm^2) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.....	241
Figure 127 : Evolution des concentrations des amibes (Amibes/ cm^2) dans les biofilms des trois bancs. Courbe rouge : référence, courbe verte : traitement continu (0,1 ppm de ClO_2), courbe bleue : traitement discontinu (10 mg/jour). La ligne verticale en pointillés représente l'arrêt des traitements.....	241
Figure 128 : Evolution des concentrations de ClO_2 au cours d'un traitement continu à 0,05 ppm de ClO_2 (courbe rouge) et du traitement discontinu à 50 mg/jour (courbe verte). Les losanges bleus représentent les heures d'injection de ClO_2 du traitement discontinu.....	243
Figure 129 : Evolution des concentrations de l'ATP ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu (courbe verte), traitement discontinu (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.	244
Figure 130 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log_{10} UFC/ cm^2) dans les biofilms : témoins (courbe rouge) traitement continu (courbe verte), traitement discontinu (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements.	245

Figure 131 : Evolution de la concentration des "bactéries totales" ($\text{Log}_{10} \text{ bact tot/cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu (courbe verte), traitement discontinu (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements. 245

Figure 132 : Evolution de la concentration des "L. pneumophila totales" ($\text{Log}_{10} \text{ Lp tot/cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu (courbe verte), traitement discontinu (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements. 246

Figure 133 : Evolution des concentrations amibes (amibes/cm²) dans les biofilms non traités (courbe rouge) et dans les biofilms traités par le ClO₂ injecté en continue à une concentration de 0,05 ppm (courbe verte) et en discontinu à 50 mg/jour (courbe bleue). La ligne rouge représente l'arrêt des traitements. 247

Figure 134 : Evolution des concentrations de ClO₂ au cours d'un traitement continu à 0,05 ppm de ClO₂ (carrés rouges) et d'un traitement discontinu à 25 mg/jour (triangles verts). Les losanges bleus représentent les heures d'injection de ClO₂ lors du traitement discontinu. 249

Figure 135 : Evolution de la concentration en ATP (pmol/cm²) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements. 250

Figure 136 : Evolution de la concentration des bactéries cultivables ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements. 251

Figure 137 : Evolution de la concentration des "bactéries totales" ($\text{Log}_{10} \text{ bact tot/cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements. 252

Figure 138 : Evolution de la concentration des L. pneumophila totales" ($\text{Log}_{10} \text{ Lp tot/cm}^2$) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements. 253

Figure 139 : Evolution de la concentration des amibes (amibes/cm²) dans les biofilms : témoin (courbe rouge), traitement continu à 0,05 ppm (courbe verte), traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements. 253

Figure 140 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin dans les biofilms traités en continu à 0,1 ppm (courbe rouge) et 0,05 ppm (courbe verte : essai 1, courbe bleue : essai 2) de ClO₂. La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements continu à 0,1 ppm et 0,05 ppm (essai 1), la ligne continue rouge représente l'arrêt du traitement continu à 0,05 ppm (essai 2). 258

Figure 141 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin dans les biofilms traités à 10 mg/jour (courbe rouge), 50 mg/jour (courbe verte) et 25 mg/jour (courbe bleue). La ligne pointillée rouge représente l'arrêt des traitements discontinus à 10 et 50 mg/j, la ligne continue rouge représente l'arrêt du traitement discontinu à 25 mg/j. 260

Figure 142 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin dans les biofilms traités par un traitement discontinu à 25 mg/j (courbe bleue) et un traitement continu (courbe rouge : essai I et verte : essai II). La ligne rouge pointillée représente l'arrêt du traitement continu à 0,05 ppm (essai I), la ligne rouge continue représente l'arrêt des traitements continu à 0,05 ppm (essai II) et discontinu. 262

Figure 143 : Evolution des proportions d'ATP (A), de bactéries cultivables (B) et de bactéries totales (C) relatives au témoin dans les biofilms traités par un traitement discontinu à 50 mg/j (courbe bleue) et un traitement continu à 0,1 ppm (courbe verte). La ligne rouge pointillée représente l'arrêt des traitements. 263

Figure 144 : Evolution des températures enregistrées par le dispositif TRASAR® lors de la campagne de prélèvement réalisée sur le site de MINATEC. 273

Figure 145 : Evolution des températures moyennes de l'eau des TARs au cours de chacune des deux phases (essais) (A : essai 0,1ppm ; B : essai 0,05 ppm) de la campagne de prélèvement réalisée sur le site de MINATEC. Les points représentent les moyennes des températures enregistrées durant les 15 j précédents la date du prélèvement. 274

Figure 146 : Concentration d'ATP (pmol/cm²) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂) 275

Figure 147 : Concentration de bactéries cultivables ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂) 276

Figure 148 : Concentration de bactéries totales ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂) 276

Figure 149 : Concentration de L. pneumophila totales ($\text{Log}_{10} \text{ Lp totales/cm}^2$) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂) 277

Figure 150 : Concentration des amibes (Amibes/cm²) dans les biofilms prélevés sur les parois (murs) et sur le fond (sol) des TARs (remplissage uniforme = tour de référence, remplissage hachuré = tour traitée au ClO₂) 278

Liste des figures

Figure 151 : Relation entre températures de l'eau des tours et concentrations des amibes	279
Figure 152 : Evolution des concentrations de l'ATP (pmol/cm ²) dans les biofilms des substrats artificiels (A) (courbe rouge : tour de référence, courbe verte : tour traitée au ClO ₂) (B) dans la seule tour traitée au ClO ₂ à 0,1 ppm et 0,05 ppm.	280
Figure 153 : (A) Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log ₁₀ UFC/cm ²) dans les biofilms des substrats artificiels (Courbe rouge : tour de référence, courbe verte : tour traitée au ClO ₂) (B) les vitesses de colonisation initiales (Log ₁₀ UFC/jour (remplissage uniforme : tour de référence, remplissage hachuré : tour Securox).	281
Figure 154 : (A) Evolution des concentrations des bactéries totales (Log ₁₀ bact tot/cm ²) dans les biofilms des substrats artificiels (courbe rouge : tour de référence, courbe verte : tour traitée au ClO ₂) (B) les vitesses de colonisation initiales (Log ₁₀ bact tot /jour (remplissage uniforme : tour de référence, remplissage hachuré : tour Securox).	282
Figure 155 : Evolution des concentrations de "L. pneumophila totales" (Log ₁₀ Lp/cm ²) dans les biofilms développés sur substrats artificiels (courbe rouge : tour de référence, courbe rouge : tour traitée au ClO ₂).....	282
Figure 156 : Evolution des températures des bassins froids des tours lors de la campagne 2010.....	287
Figure 157 : Concentrations d'ATP (pmol/cm ²) dans les biofilms des murs et des sols des tours traitées par DBNPA/ISO (remplissage uniforme) et par ClO ₂ /ISO (remplissage hachurée).	288
Figure 158 : Concentrations des bactéries cultivables (Log ₁₀ UFC/cm ²) dans les biofilms des sols et des murs des tours traitées au DBNPA/ISO (remplissage uniforme) et le ClO ₂ /ISO (remplissage hachuré).	288
Figure 159 : Concentrations des bactéries totales (Log ₁₀ N/cm ²) dans les biofilms des parois et du fond des tours. Remplissage uniforme : DBNPA/ISO, remplissage hachuré : ClO ₂ /ISO.....	289
Figure 160 : Concentrations des amibes (amibes/cm ²) dans les biofilms des parois et du fond des tours. Remplissage uniforme : DBNPA/ISO, remplissage hachuré : ClO ₂ /ISO.....	290
Figure 161 : Evolution des concentrations d'ATP (pmol/cm ²) dans les biofilms développés sur substrats artificiels sous l'effet de deux traitement biocides DBNPA/ISO et ClO ₂ /ISO.	291
Figure 162 : Evolution des concentrations des bactéries cultivables (Log ₁₀ UFC/cm ²) dans les biofilms développé sur des substrats artificiels sous l'effet de deux traitement biocides DBNPA/ISO et ClO ₂ /ISO.....	292
Figure 163 : Evolution des concentrations des bactéries totales dans les biofilms développé sur des substrats artificiels sous l'effet de deux traitement biocides DBNPA/Isouthiazolone et ClO ₂ /Isouthiazolone.	292
Figure 164 : Evolution des concentrations des amibes (amibes/cm ² , courbes continues, échelle à gauche) dans les biofilms prélevés des substrats artificiels. (A) Evolution simultanée de la température (C°) des bassins froids (courbe en pointillés, échelle à droite) et (B) évolution simultanée de la concentration des bactéries totales (Log ₁₀ bact tot/cm ² : courbes en pointillés, échelle à droite). Courbes rouges : traitement DBNPA/Isouthiazolone, courbes verte : traitement ClO ₂ /Isouthiazolone.	294
Figure 165 : Comparaison des résultats obtenus par l'analyse des biofilms prélevés sur les substrats artificiels et les substrats en place pour l'ATP (pmol/cm ²) (A), les bactéries cultivables (Log ₁₀ UFC/cm ²) (B), les bactéries totales (Log ₁₀ bact tot/cm ²) (C), et les amibes (D).	295
Figure 166 : Comparaison des performances des traitements DBNPA/ISO (remplissage rouge) et ClO ₂ /ISO (remplissage vert) vis-à-vis des bactéries cultivables en suspension (remplissage hachuré) et fixées (remplissage uniforme) sur les substrats artificiels (A) expérience I, (B) expérience II, (C) expérience III.	296
Figure 167 : Comparaison des coefficients de variations calculés à partir d'écart types et de moyennes (A), d'une part, et à partir des médianes et des MAD (B), d'autre part. Le jeu de données est celui des concentrations en bactéries cultivables de l'eau et des biofilms développés sur substrat artificiel durant la campagne 2010.	297
Figure 168 : Évolution des concentrations de ClO ₂ (courbe vertes, échelle à droite) et d'H ₂ O ₂ (courbes rouges, échelle à gauche) dans les bassins froids au cours des trois phases de la campagne.....	298
Figure 169 : Flux moyen d'injection de ClO ₂ (remplissage hachuré) et d'H ₂ O ₂ (remplissage uniforme) durant chacune des trois phases de la campagne.....	299
Figure 170 : (A) Evolution des températures (°C) enregistrées dans les bassins froids des tours, (B) Evolution simultanée des températures enregistrées dans le bassin froid la puissance échangée (kWh) dans la tour PEROX, (C) Evolution simultanée des températures enregistrée dans le bassin froid la puissance échangée dans la tour SECUROX. Courbe rouge : tour Perox, courbe verte : tour Securox. Courbe continue : température, courbes en pointillés : puissance.....	300
Figure 171 : Puissances échangées dans les tours de refroidissement lors des expériences I (A), II (B) et III (C). (D) : moyennes des puissances échangées par tour lors des 3 expériences.	301
Figure 172 : Concentrations de l'ATP (pmol/cm ²) dans les biofilms prélevés de la tour traitée au ClO ₂ : remplissage hachuré, et à l'H ₂ O ₂ /UV : remplissage uniforme.....	302
Figure 173 : Concentrations des bactéries cultivables dans les biofilms prélevés de la tour traitée au ClO ₂ (remplissage hachuré) et à l'H ₂ O ₂ /UV (remplissage uniforme).....	303
Figure 174 : Concentrations des bactéries totales dans les biofilms prélevés de la tour traitée au ClO ₂ (remplissage hachuré) et à l'H ₂ O ₂ /UV (remplissage uniforme).....	303

Figure 175 : Concentrations des amibes dans les biofilms prélevé de la tour traitée au ClO_2 (remplissage hachuré) et à l' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ (remplissage uniforme) 304

Figure 176 : Evolution des concentrations en ATP (pmol/cm^2) des biofilms développé sur substrats artificiels et soumis aux traitements Perox (courbes rouges) et Securox (courbes vertes). 305

Figure 177 : Evolutions simultanées des concentrations **(A)** des bactéries cultivables ($\text{Log}_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$) **(B)** des "bactéries totales" ($\text{Log}_{10}\text{N}/\text{cm}^2$) (courbe en pointillés) et des températures (A et B) des bassins froids (courbe continue). 306

Figure 178 : Evolutions simultanées de la concentration en amibes (courbes pointillées) et de la température des bassins froids (courbes continue) dans la tour traitée par le Perox (courbe rouge) et la tour traité par le Securox (courbes vertes) 307

Figure 179 : Vitesses initiales de production d'ATP (A) et de colonisation des supports artificiels par les bactéries cultivables (B) et les bactéries totales (C) entre J0 et J14. Comparaison des traitements Securox et Perox 308

Figure 180 : Comparaison de l'état de contamination des tours à la fin de l'expérience n avec les vitesses initiales de colonisation des supports artificiels de l'expérience n+1. La comparaison porte sur l'ATP (A), les bactéries cultivables (B) et les bactéries totales (C). Seules les valeurs correspondantes aux biofilms des parois ont été considérées ici 310

Figure 181 : Comparaison des charges bactériennes de l'eau (remplissage hachuré) et des biofilms (remplissage uniforme) du point de vue de la concentration en ATP (A) et de celle des bactéries cultivables (B) sous l'effet des traitements Perox (colonnes rouges) et Securox (colonnes vertes). Les étoiles marquent les dates pour lesquelles il n'y a pas de mesure disponible sur l'eau. 313

Figure 182 : Comparaison des coefficients de variations des concentrations des bactéries cultivables calculés à partir d'écart types et de moyennes d'une part (A), et à partir des MAD (median absolute deviation) et des médianes (B). Le jeu de données est celui des concentrations en bactéries cultivables de l'eau et des biofilms développés sur substrat artificiel durant la campagne 2011. 314

X.2 Annexes 2 : liste des tableaux

Tableau 1: Proportions des principaux composants des EPS dans le cas d'un biofilm à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Flemming et al., 2001).....	26
Tableau 2 : Principales caractéristiques des cinq génomes séquencés de cinq <i>L. pneumophila</i> (D'Auria et al., 2010).....	43
Tableau 3 : Bilan de l'ensemble des essais réalisés pour l'étude du procédé SECUROX. Valeurs théoriques des concentrations ou des quantités de ClO_2 appliquées.	91
Tableau 4 : Principales caractéristiques des TARs des deux sites retenus pour l'étude de la performance de ClO_2 et de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	92
Tableau 5 : Caractéristiques des traitements appliqués lors de la campagne de prélèvement de 2009.....	93
Tableau 6 : Caractéristiques des traitements appliqués lors de la campagne de traitement de 2010.....	94
Tableau 7 : Caractéristiques des traitements appliqués lors de la campagne de traitement de 2011.....	94
Tableau 8 : Différents taux de traitement appliqués pour le procédé $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	96
Tableau 9 : Gènes amplifiés, amorces et conditions de mise en œuvre de la PCR.....	110
Tableau 10 : Composition du milieu de culture pour le repiquage des amibes.....	112
Tableau 11 : Liste des indicateurs pris en considération et des techniques employées.....	121
Tableau 12 : Caractérisation physiologique, biochimique et immunologique des isolats environnementaux de la source soufre.....	126
Tableau 13 : Bilan de la classification en sérogroupes de <i>L. pneumophila</i>	127
Tableau 14 : Résultats des caractérisations moléculaire et immunologique des isolats environnementaux de la source Soufre.....	131
Tableau 15 : Pourcentage d'identité des séquences mip des isolats environnementaux et des isolats cliniques (selon le logiciel MEGA, http://www.megasoftware.net/).....	136
Tableau 16 : Classification des 32 isolats environnementaux issus de la source Soufre.....	138
Tableau 17 : Effet des traitements biocides sur la viabilité de <i>L. pneumophila</i> sg 1.....	148
Tableau 18 : Homologies des séquences du gène ARNr 16s des souches cliniques de <i>L. pneumophila</i> ssp Alcoy, Corby, Paris, Philadelphia, Lens et des souches environnementales <i>L. pneumophila</i> sg 1 LAXB8 et 24 obtenues par le logiciel MEGA 5 (http://www.megasoftware.net/).....	151
Tableau 19 : Homologie des séquences du gène wzm des souches cliniques de <i>L. pneumophila</i> ssp Alcoy, Corby, Paris, Philadelphia, Lens et des souches environnementales <i>L. pneumophila</i> sg 1 LAXB8 et 24 obtenues par le logiciel MEGA 5.....	151
Tableau 20 : Homologies des séquences du gène wzt des souches cliniques de <i>L. pneumophila</i> ssp Alcoy, Corby, Paris, Philadelphia, Lens et des souches environnementales <i>L. pneumophila</i> sg 1 LAXB8 et 24 obtenues par le logiciel MEGA 5.....	151
Tableau 21 : Vitesses moyennes de dégradation de H_2O_2 dans les différentes conditions testées et flux d' H_2O_2 théoriques nécessaires pour le maintien des concentrations stables.....	163
Tableau 22 : Bilan des essais de traitement Perox réalisés au laboratoire.....	167
Tableau 23 : Concentrations des paramètres biologiques du biofilm analysés à T_0	189
Tableau 24 : Comparaison des performances des traitements à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 vis-à-vis des concentrations de l'ATP.....	191
Tableau 25 : Comparaison des performances des traitements à 30 et 50 ppm d' H_2O_2 vis-à-vis des concentrations des bactéries cultivables.....	192
Tableau 26 : Comparaison des performances des traitements aux UV et à $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ à 10, 30 et 50 ppm d' H_2O_2 vis-à-vis des concentrations de l'ATP.....	194
Tableau 27 : Comparaison des performances des traitements au UV et à $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ à 10, 30 et 50 ppm d' H_2O_2 vis-à-vis des concentrations des bactéries cultivables.....	194
Tableau 28 : Comparaison des traitements en termes de reviviscence de l'activité métabolique et des bactéries cultivables.....	196
Tableau 29 : Pourcentages de COD et du COT ($\text{COT (D)}_{\text{témoin}} / \text{COT (D)}_{\text{après traitement}}$) éliminés de la solution de tryptone après les traitements biocides.....	206
Tableau 30 : Pourcentages de COD (COD/COT) dans les solutions de matières organiques.....	206
Tableau 31 : Pourcentages d'augmentation des concentrations du COD (COD J35/ COD J0) en fin d'incubation (J35).....	207
Tableau 32 : Variation du pourcentage de CODB de la solution de tryptone en fonction des traitements. Pourcentages calculés par référence à la concentration en COD à t_0 (immédiatement après les traitements).	209
Tableau 33 : Proportions de COD et de COT résiduel après l'exposition au traitement H_2O_2 (50ppm)/ $\text{UV}_{254\text{nm}}$ pendant 1h, 6h et 24 h.....	211

Tableau 34 : Pourcentages (%) de COD éliminé dans les solutions de matières organiques après 1 h et 6 h d'exposition aux traitements biocides ($1 - \text{CODtCOD0}$)x100 (moyennes et écarts types calculés sur deux mesures)	216
Tableau 35 : Evolution des pourcentages (%) du COD [$100x(\text{CODCOT})$] dans les solutions de matières organiques sous l'effet des traitements biocides (moyennes et écarts types calculés sur deux mesures).....	216
Tableau 36 : Concentration de CODB (ppm) dans les solutions de matières organiques exposées aux traitements biocides pendant 1 h et 6 h et incubées pendant 35 jours en présence d'une suspension bactéries environnementales. Le CODB est calculé selon l'équation $\text{CODB} = \text{CODt0} - \text{CODt30j}$	217
Tableau 37 : Pourcentage de CODB (CODB/COD) dans les solutions de matière organiques (moyennes de 2 mesures) .	218
Tableau 38 : Résumé des valeurs de la concentration en ClO_2 , de la température et de la conductivité associées au circuit de référence et aux circuits "essais" de la 1 ^{ère} phase d'expérimentation.....	236
Tableau 39 : Approche théorique des consommations quotidiennes de ClO_2 dans les réacteurs "essais".	237
Tableau 40 : Résumé des valeurs de la concentration en ClO_2 , de la température et de la conductivité associées au circuit de référence et aux circuits "essais" de la 2 ^{ème} phase d'expérimentation.	242
Tableau 41 : Résumé des valeurs de la concentration en ClO_2 , de la température et de la conductivité associées au circuit de référence et aux circuits "essais" de la 3 ^{ème} phase d'expérimentation.....	248
Tableau 42 : Concentrations des paramètres biologiques des biofilms analysés à T0.....	256
Tableau 43 : Résumé des valeurs de la concentration en ClO_2 , de la température et de la conductivité associées aux circuits "essais" lors des traitements continus à 0,1 et 0,05 ppm de ClO_2	257
Tableau 44 : Evolution des paramètres physicochimiques ($[\text{ClO}_2]$, température et conductivité) lors des traitements discontinus à 10, 25 et 50 mg/jour de ClO_2	259
Tableau 45 : Concentrations moyennes et quantités totales de ClO_2 injectées quotidiennement.....	261
Tableau 46 : Comparaison de l'efficacité des traitements biocides au ClO_2 du point de vue de l'ATP (résultats standardisés, %).	264
Tableau 47 : Comparaison de l'efficacité des traitements biocides au ClO_2 du point de vue des bactéries cultivables (Log_{10} UFC).....	264
Tableau 48 : Comparaison de l'efficacité des traitements biocides au ClO_2 du point de vue des bactéries totales (Log_{10} bactéries totales)	264
Tableau 49 : Estimation de la reviviscence en termes d'ATP, lors des traitements biocides au ClO_2	266
Tableau 50 : Estimation de la reviviscence du point de vue de la concentration des bactéries cultivables exprimée en Log lors des traitements biocides au ClO_2	266
Tableau 51 : Comparaisons des résultats obtenus par l'analyse des substrats artificiels et les substrats en place lors de la campagne de 2009.....	284
Tableau 52 : Comparaison des résultats de l'analyse de l'eau et de l'analyse des biofilms des substrats artificiels du point de vue des bactéries cultivables et des "L. pneumophila totales" de la tour traitée au ClO_2	285
Tableau 53 : Rappel des valeurs caractéristiques des traitements (moyennes par expérience).	299
Tableau 54 : Analyse de variance par Anova multifactorielle de 4 variables expliquées et 2 variables explicatives	311
Tableau 55 : Comparaisons des résultats d'analyse des biofilms des supports en place et des supports artificiels lors des campagnes de prélèvements de 2010 et de 2011.....	316

X.3 Annexe 3 : Publication et brevet

Publication: **Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa.**

Brevet collectif : Procédé H₂O₂/UV et appareillages pour la désinfection des eaux.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa

Zineddine Chaabna¹, Françoise Forey², Monique Reyrolle², Sophie Jarraud^{2,3}, Danièle Atlan⁴, Dominique Fontvieille¹ and Christophe Gilbert^{4*}

Abstract

Background: Several cases of legionellosis have been diagnosed in the same French thermal spa in 1986, 1994 and 1997. *L. pneumophila* serogroup 1 (Lp1) strains have been isolated from several patients, but the source of contamination was not identified despite the presence of different Lp1 in water samples of the three natural springs feeding the spa at this period.

Results: Our strategy was to investigate *L. pneumophila* (Lp) strains from natural biofilms developed in a sulphur-rich warm spring of this contaminated site. Biofilm analysis revealed the presence of three Lp serogroups (Lp1, Lp10 and Lp12). Surprisingly, Lp10 and Lp12 were not reported in the previous described studies from water samples. Besides, the new seven Lp1 we isolated exhibit a high molecular diversity and have been differentiated in five classes according to their DNA genome patterns obtained by PFGE and *mip* sequences. It must be noted that these DNA patterns are original and unknown in databases. Interestingly, the 27 Lp environmental strains we isolated display a higher cytotoxicity and virulence towards the amoeba *Acanthamoeba castellanii* than those of known Lp1 epidemic strains.

Conclusion: The characteristics of *Legionella pneumophila* Lp1 strains isolated from the warm spring are in agreement with their presence in biofilms and their probable long-term persistence in this ecosystem.

Keywords: *Legionella pneumophila*, Biofilms, Warm spring, Biodiversity, Virulence

Background

The human pathogen *Legionella pneumophila* causes a severe pneumonia so-called legionellosis or Legionnaires' disease (LD); this Gram negative bacterium was identified after the 1976 Philadelphia outbreak during the American Legion convention where 29 people succumbed [1]. Further outbreaks were associated with aerosol-producing devices like showers, cooling towers, whirlpools and fountains, but Rowbotham was the first to show a link between *Legionella* ecology and LD [2,3]. Actually, *L. pneumophila* is ubiquitous in aquatic environment and is able to multiply intracellularly in fresh water protozoa.

L. pneumophila displays 15 serogroups but the majority of human cases are due to the serogroup1 (Lp1) (84% worldwide, 95% in Europe) [4,5]. Lp1 is frequently found in the environment and accounts for 28% of environmental isolates in France. Other *Legionella* species, as *L. anisa*, *L. dumoffii* and *L. feeleii* that frequently colonize the water distribution systems, are rarely involved in human disease [4]. These data suggest that the high frequency of LD involving Lp1 is not due to its predominance in the environment but rather linked to a higher virulence than other species or serogroups of *Legionella*. The only exception is *Legionella longbeachae* accounting for 30% of human cases in Australia and New-Zealand, and even 50% of cases in South Australia [6]. In contrast to *L. pneumophila*, *L. longbeachae* is found predominantly in potting soil and transmitted by inhalation of dust of contaminated soils.

* Correspondence: christophe.gilbert.bio@univ-lyon1.fr

⁴Université de Lyon, CNRS UMR 5240, Université Lyon1, Villeurbanne F-69622, France

Full list of author information is available at the end of the article

A lot of attention has been paid to the identification of Lp1 virulence factors. It is now recognized that the co-evolution between eukaryotic hosts and *L. pneumophila* had led to the selection of a set of virulence factors which allow this bacterium to exploit host cellular processes; among these factors, eukaryotic-like proteins, encoded by genes identified on the basis of genome sequence analysis, are involved in different steps of the *Legionella* intracellular cycle [5,7-10]. Recently, comparison of *Legionella* genome sequences has shown that some genes encoding the lipopolysaccharide biosynthesis were specific of Lp1 and constitute specific markers for the molecular typing [11].

We focused our attention on the identification and virulence capacities of different serogroups of *L. pneumophila* strains present in the French thermal spa where five cases of legionellosis were diagnosed in 1986, following by two cases in 1994 and 1997 [12,13]. In order to determine the source of infection, water samples had been collected throughout the water distribution system as well as the three natural springs (S, sulphur; A, alum and P, cold) and two bore holes feeding the system. Eighty one *L. pneumophila* strains belonging to five serogroups (27 Lp1, 1Lp2, 62 Lp3, 3 Lp6 and 9 Lp13) had been identified from water samples collected over a two-year period (1997–1998); thus this water system appeared mainly contaminated by Lp1 and Lp3, also present in two natural spring (S and A). Nevertheless, comparative analysis of genomic DNA, by PFGE (“Pulse Field Gel Electrophoresis”), of both clinical Lp1 isolated from patients and environmental Lp1 isolates did not allow identifying the source of infection.

In this study, our goal was to identify legionellae directly virulent towards protozoa and as a consequence with the ability to survive in a specific environment, like the spring S characterized by a temperature of 37°C and a high level of sulphates and thiosulphates as the calcium and sodium salts [12]. Thus, we isolated legionellae from natural biofilms developed on glass slides immersed in this contaminated spring. After typing by different approaches, the DNA genome diversity of these environmental Lp strains was analyzed, and their virulence and cytotoxicity towards the amoeba *Acanthamoeba castellanii* were compared to those of well-known French clinical isolates (Lp1 strains Lens, Paris and Lorraine).

Results

Phenotypic analyses and serotyping of environmental *L. pneumophila* isolates

Legionella cells developed in natural biofilms in the spring S were extracted according to the French AFNOR NFT90-431 procedure as described in Material and Methods. Independent bacterial colonies developed on GVPC in 5 days at 37°C were screened according to a fritted glass appearance with a green gleam. This assay

provided us 5 isolates named LAXA from the campaign of August 2010 and 25 isolates named LAXB from December 2010 (Table 1). Then, serotyping was performed with two different latex agglutination tests (Oxoid kit and bioMérieux reagents) consisting of blue latex particles sensitized with specific rabbit antibodies of different serogroup (sg) antigens of *L. pneumophila*. These tests allowed us to show that all *Legionella* strains we isolated from biofilms belong to the species *pneumophila* and to three sg (1, 10 and 12) with the following distribution: 7 Lp1, 5 Lp10 and 15 Lp12 (Table 1). At this stage, we were not able to characterize 3 strains by serotyping (LAXB11, LAXA53 and LAXA54). Besides, the 27 environmental positively serotyped Lp isolates also displayed an auxotrophy for cysteine, a known characteristic of legionellae (data not shown). Interestingly, analysis of the catalase activity of these 27 Lp strains allowed us to show that Lp. strains were characterized by a very weak production of gas bubbles (Cat⁻ phenotype) from the substrate H₂O₂. Actually, *L. pneumophila* displays two genes, *kata* and *katB*, encoding catalase-peroxidases, but functionally these enzymes exhibit only the peroxidatic activity [14,15]. By contrast *L. anisa* and *L. micdadei* (Table 1) and *E. coli* DH5α (data not shown) were able to generate rapidly numerous gas bubbles (Cat⁺⁺ phenotype) and *L. longbeachae* and *L. taurinensis* were characterized by a clear gas emission but at a significantly lower rate than *L. anisa*. Thus, the Cat⁻ phenotype can be considered as a good tool for screening *L. pneumophila* strains among *Legionella* genus [16].

DNA analysis and molecular diversity of environmental *L. pneumophila* strains

Molecular typing of the all environmental isolates allowed us to confirm the classification obtained by serotyping (Table 1). Actually, we used current standards in molecular diagnosis of the genus *Legionella*: *mip* gene (“Macrophage infectivity potentiator”), 16S rRNA genes [17]. Both genes were amplified by PCR from bacterial lysates of the 30 environmental isolates. Then, the discrimination of the species *pneumophila* was performed by amplifying the gene *lpg0774* [18]. Finally, Lp1 typing of seven environmental *Legionellae* was obtained by independent gene amplifications of *lpg1905* and *wzm* (a gene belonging to the cluster coding for the lipopolysaccharide biosynthesis) [11,18]: LAXA21, LAXB6, LAXB8, LAXB12, LAXB22, LAB24 and LAXB25 (Table 1; Figure 1).

Thus, the LAXB environmental strains we isolated from the spring S mainly belong to Lp12 (15 isolates) and to a lesser extent to Lp1 (6 isolates) and Lp10 (3 isolates); it is interesting to underline that the isolate LAXB11 was classified as *L. pneumophila* only at the molecular level, and not by serotyping which could suggest a new serogroup. With regard to the LAXA strains, Lp10 (2 isolates) and Lp1

Table 1 Typing of 30 environmental *Legionella* isolates from biofilms developed in the contaminated S spring

Campaign	Environm. isolates	Catalase activity	Serotyping		Molecular typing					Typing
			Oxid kit	bioMérieux reagents	16S rRNA	mip	lpg 1905	lpg 0774	wzm	
LAXB	1	-	Lp2-14	Lp10	+	+	+	-	-	Lp
	2	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	3	-	Lp2-14	Lp10	+	+	+	-	-	Lp
	4	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	5	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	6	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
	7	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	8	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
	9	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	10	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	11	-	NSR*	NSR*	+	+	+	-	-	Lp
	12	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
	13	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	14	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	15	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	16	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	17	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	18	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	19	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	20	-	Lp2-14	Lp10	+	+	+	-	-	Lp
	21	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	22	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
	23	-	Lp2-14	Lp12	+	+	+	-	-	Lp
	24	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
	25	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
LAXA	21	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
	22	-	Lp2-14	Lp10	+	+	+	-	-	Lp
	23	-	Lp2-14	Lp10	+	+	+	-	-	Lp
	53	-	NSR*	NSR*	-	+	-	-	-	non L
	54	-	NSR*	NSR*	-	+	-	-	-	non L
Clinical strains	Lp1 Lens	-	Lp1	Lp1	+	+	+	-	+	Lp1
	Lens dotA	-	Nd [§]	Nd [§]	+	+	+	-	+	Lp1
	Lp1 Paris	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
	Lp1 Lorraine	-	Lp1	Lp1	+	+	+	+	+	Lp1
	Lp3	-	L	Lp3	Nd [§]	+	+	-	-	Lp
	Lp8	-	L	Lp6	Nd [§]	+	+	-	-	Lp
	<i>L. anisa</i>	++	L	<i>L. anisa</i>	+	+	-	-	-	L
	<i>L. taurinensis</i>	+	Nd [§]	Nd [§]	Nd [§]	+	Nd [§]	Nd [§]	Nd [§]	L
	<i>L. micdadei</i>	++	L	Nd [§]	Nd [§]	Nd [§]	Nd [§]	Nd [§]	Nd [§]	L
<i>L. longbeachae</i>	+	L	<i>L. longbeachae</i>	+	+	-	-	-	L	

* NSR: No Serotyping Reaction.

§ Nd: not determined.

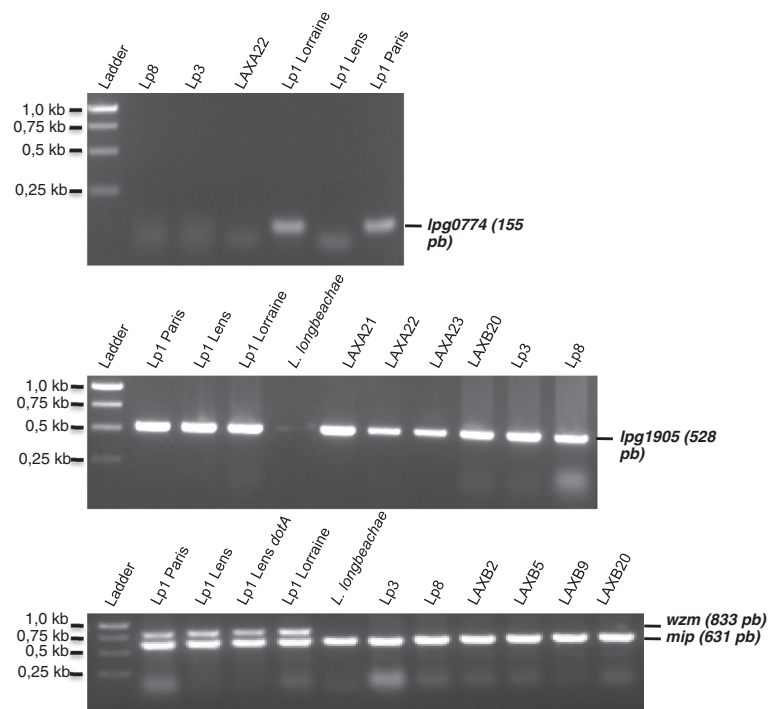


Figure 1 Examples of PCR Amplification of several *Legionella pneumophila* genes: *lpg0774*, *lpg1905*, *wzm* and *mip*. The ladder was the GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas SM0311).

(1 isolate) were also identified, but Lp12 was not detected. Two isolates, LAXA53 and LAXA54, were classified as non *Legionella* species and were indeed further identified as *Mycobacterium* isolates on the basis of their 16S rRNA sequences using a different set of 16S rRNA primers (data not shown). The small number of Lp isolated in the LAXA campaign does not allow to draw any conclusion about the persistence of Lp between August and December 2010.

In order to assess the molecular diversity, DNA of 26 LAXA and LAXB strains (7 Lp1, 5 Lp10 and 14 Lp12; LAXB10 strain did not grow anymore after a long term freezing period) was analyzed by PFGE and led to the identification of five main patterns (PST1 to PST5). It is clear that these five patterns are different from those of other known *L. pneumophila* clinical isolates as Lp1 strains Lorraine, Biarritz and Paris (see Additional file 1; Figure 2) but also Lp1 Lens, Philadelphia and Corby (data not shown). It is interesting to stress that Lp10 and Lp12 strains were grouped in two independent specific patterns (PST4 and PST3, respectively). By contrast, the 7 Lp1 strains were differentiated in three distinct patterns (PST1, PST2 and PST5) which suggest a genomic diversity.

In order to assess more finely this molecular diversity, the *mip* sequences of 27 *L. pneumophila* strains were determined and compared. All *mip* sequences were performed on both strands and no mismatch was identified. The 27 sequences comparison led us to identify three different types of *mip* sequence, so-called *mip1*, *mip2* and

mip3. These sequences exhibit a high identity (> 99%) and only differ by few substitutions (see Additional file 2): 5 substitutions between *mip1* and *mip2* sequences, 4 between *mip1* and *mip3* and a unique substitution between *mip2* and *mip3*. It must also be underlined that these three *mip* sequences are very close to those of known clinical isolates (identity > 99, 6%), and the *mip3* sequence is even completely identical to the *mip* sequence of the Lp1 clinical strain Corby (see Additional file 2). Actually, this sequence-based classification not only confirmed results obtained with other typing approaches (serotyping and molecular typing) but also allowed us to position the different environmental strains within the *specium pneumophila* (Table 2; Figure 3). Analyses of *mip* sequences confirmed the homogeneity of Lp12 strains belonging to the unique pulsotype PST3 and characterized by a unique *mip* sequence (*mip2*) (Table 2; Figure 2). Besides, this approach revealed a genetic diversity within the five Lp10 strains belonging to the pulsotype PST3 but differentiated by two *mip* sequences, *mip2* and *mip3*. Finally, a high genetic diversity was also observed within PST1 and PST2 pulsotypes, where the environmental Lp1 strains could be discriminated according to the three *mip* sequences (Table 2).

Cytotoxicity to *Acanthamoeba castellanii*

Alamar blue was used to quantify the viability of remaining amoebae after *Legionella* infection (Figure 4a) and the cytotoxicity was assessed by percent of killed

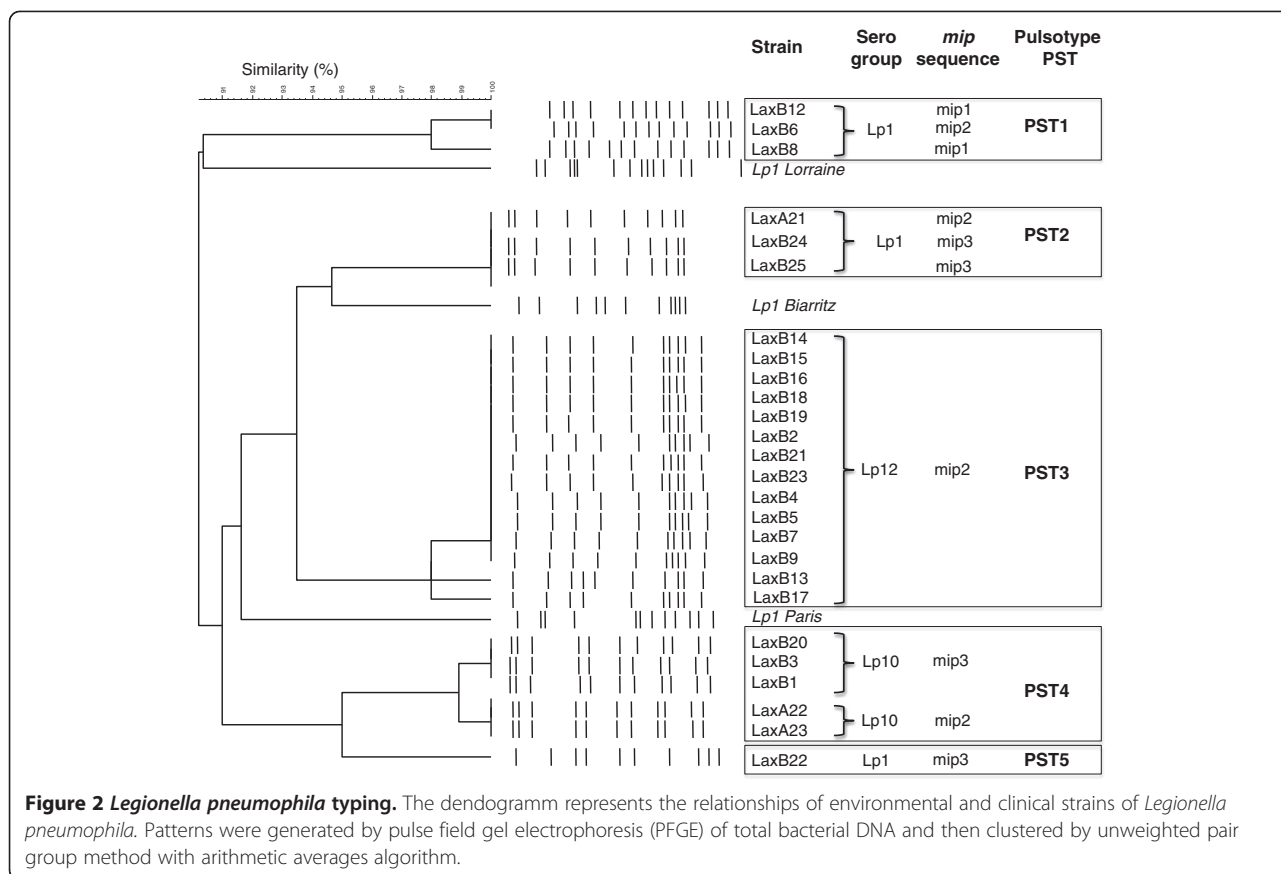


Figure 2 Legionella pneumophila typing. The dendrogram represents the relationships of environmental and clinical strains of *Legionella pneumophila*. Patterns were generated by pulse field gel electrophoresis (PFGE) of total bacterial DNA and then clustered by unweighted pair group method with arithmetic averages algorithm.

amoebae. The mean cytotoxicity of Lp1 clinical strains (Lens, Paris and Lorraine) was estimated to 40 and 73% after 24 h and 48 h post-infection, respectively. As expected, the avirulent mutant *dotA*, derived from the strain Lens [19] did not display any significant cytotoxicity

Table 2 Classification of the 27 environmental *L. pneumophila* strains according to serogroup (sg), pulsotype (PST) and mip sequence

Class	Sg	PST	mip	Environmental isolates	Isolate number
1	sg1	PST1	mip1	LAXB8, LAXB12	2 7 Lp1
2	sg1	PST1	mip2	LAXB6	1
3	sg1	PST2	mip2	LAXA21	1
4	sg1	PST2	mip3	LAXB24, LAXB25	2
5	sg1	PST5	mip3	LAXB22	1
6	sg10	PST4	mip2	LAXA22, LAXA23	2 5 Lp10
7	sg10	PST4	mip3	LAXB1, LAXB3, LAXB20	3
8	sg12	PST3	mip2	LAXB2, LAXB4, LAXB5, LAXB7, LAXB9, LAXB13, LAXB14, LAXB15, LAXB16, LAXB17, LAXB18, LAXB19, LAXB21, LAXB23, LAXB10*	15 15 Lp12

27 27

*LAXB10 was positioned into the class 8 according to serotyping and mip sequence.

(0 and 4% at 24 h and 48 h, respectively). Environmental strains isolated from the source S appeared much more cytotoxic than Lp1 clinical strains, especially at 48 post-infection: actually environmental Lp1, Lp10 and Lp12 are characterized by a cytotoxicity of 100% whatever their pulsotype (PST1, PST2 and PST5) or their *mip* sequence (*mip1*, *mip2* or *mip3*) (Figures 4a and 4b).

Virulence towards *Acanthamoeba castellanii*

Lp1 clinical strains involved in LD outbreaks (Lens, Lorraine) and the worldwide epidemic and endemic strain Paris were used as virulent references. 1×10^5 and $4, 5 \times 10^5$ extracellular clinical Lp1 cells were present in 3 μ l samples taken after a 24 h and 48 h period of *A. castellanii* infection, respectively (Figure 4c). In the same periods, legionella cells released from amoeba cells infected with the *dotA* mutant were 100-fold less numerous. Interestingly, the number of extracellular *Legionellae* cells resulting from amoeba infections with environmental strains was very close to that of clinical Lp1 with the exception of extracellular Lp12 strains associated with a 10-fold increase after a 48 h-period of infection. No significant difference of virulence was observed between the different classes of environmental Lp1 at 48 h post-infection, even if

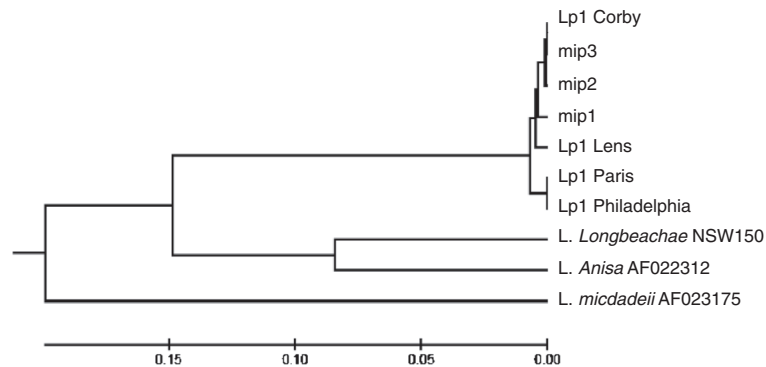


Figure 3 Phylogenetic tree (Neighbor-joining) of *mip* sequences from *L. pneumophila* sg 1 clinical and environmental (*mip1*, *mip2* and *mip3*) strains and *L. non-pneumophila* strains.

some strains appeared to present a weak delay of virulence at 24 h post-infection (Figure 4d).

A co-infection experiment was also conducted in *A. castellanii* with two representative strains of Lp1 (LAXB24) and Lp12 (LAXB2) environmental isolates. Duplex PCR analysis (using *wzm* and *lpg1905* primers) of extracellular bacteria revealed that 95% of 40 clones

analyzed belonged to Lp12 strain (LAXB2), indicating the rapid and advantageous development of this Lp12 strain in competition to the Lp1 strain.

Discussion

Our original approach of isolation of *L. pneumophila* cells from natural biofilms allowed to extend the knowledge of

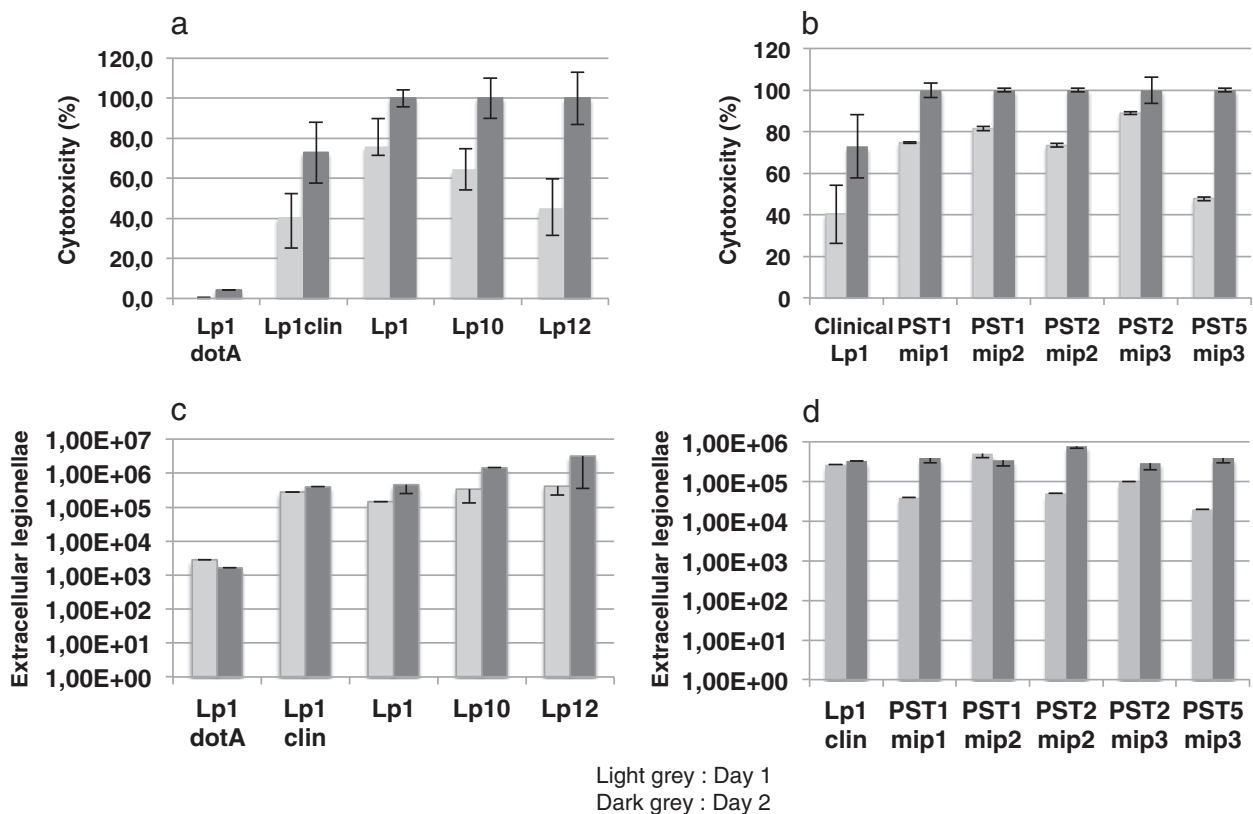


Figure 4 Quantification of cytotoxicity and virulence of environmental *L. pneumophila* strains towards the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. Lp1 dotA : *dotA* mutant of Lp1 Lens; Lp1 clin: means of cytotoxicities (a) and virulences (c) of three clinical Lp1 strains (Lens, Paris and Lorraine). These means of cytotoxicities (b) and virulences (d) of three clinical Lp1 strains were compared to those of five independent pulsotypes (PST1 to PST5) of environmental Lp1 strains.

Legionellae populations contaminating a French Alpine thermal spa where several successive cases of LD occurred from 1986 to 1997. Other previous studies had reported the presence of five sg (1, 2, 3, 6 and 13) of free-living *L. pneumophila* isolated from water samples collected in different sites of the spa [12,13].

In contrast to these previous results, our work revealed that the sg 12 appears as the major population of *L. pneumophila* in biofilms developed within the spring S, a very original environment; besides, our results suggest that the 15 environmental Lp12 we isolated correspond probably to a unique strain; actually, all these Lp12 isolates could not be differentiated at the DNA level (the same pulsotype PST3 the same *mip2* sequence) or at the level of cytotoxicity towards *Acanthamoeba castellanii*. All these data raise the hypothesis of a probable recently-emerged Lp12 strain with a capacity of rapid development in this specific environment, and more particularly within protozoa present in the spring S. This hypothesis is also supported by the co-infection experiment that pointed out the potential advantage of Lp12 strain in competition with Lp1 strain during amoeba infection. This probable emergence of Lp12 gives also an explanation to the absence of detection of Lp12 free-cells in water samples analyzed in other reports [12,13]. The absence of Lp12 from the LAXA strains we isolated in August 2010 could suggest an emergence of this strain in the spring S between the month of August and the month of December.

A similar hypothesis could be drawn for the sg 10, also absent from previous reports related to this thermal spa; the five Lp10 environmental isolates also characterized by a unique pulsotype (PST4); however, differences in two *mip* sequences (*mip2* and *mip*) strongly suggests two Lp10 strains also recently appeared well-adapted in this site.

In contrast to Lp12 and Lp10, environmental Lp1 strains were already described in water samples collected from the three springs that fed the thermal spa. Unfortunately, Lp1 previously isolated from this thermal spa in 1988 and 1999 were no longer available; as a consequence, it is not possible to determine if the five classes of Lp1 we isolated result from a genetic evolution from a unique or several parental strain(s). Interestingly, the three distinct DNA patterns of environmental Lp1 were original and quite different of other known Lp1 clinical isolates involved in outbreaks. Besides, these environmental Lp1 were characterized by a higher toxicity and virulence towards amoebae than the Lp1 clinical isolates implied in outbreaks. At this stage, the possibility of a virulence decrease of Lp1 clinical isolates resulting from numerous times transfers in the laboratory cannot be ruled out. However, in our hands, no attenuation of virulence has been pointed out during the past 7 years.

We can suppose that this high virulence of environmental isolates to amoebae is in relation with a long-term persistence of Lp1 probably in biofilms within the spring S. It is now recognized that the intracellular multiplication of Lp1 in amoebae enhanced their capacity of virulence towards alveolar human macrophages [20,21]. Taking into consideration their very high virulence capacity, these environmental Lp1 strains constitute good candidates for the recurrent LD observed in this French thermal spa. Moreover, the high virulence trait of Lp12 strains isolated in the spring S must also be taken into consideration. Indeed, a Lp12 strain has already been involved in a legionnaires disease in the past [22]. The whole-genome sequence of this clinical isolate Lp12 strain 570-CO-H has been recently characterized [23]. However, high virulence in amoebae does not completely correlate to high virulence in humans. Thus, higher virulence of environmental strains (Lp1, Lp10 and Lp12) compared to references Lp1 outbreaks strains does not absolutely mean higher risk of legionellosis. This hypothesis needs to be validated by further studies to assess the virulence of these environmental isolates towards human macrophages.

Conclusion

This study highlights the role of mixed biofilms (protozoan and bacteria) of a site in the multiplication of virulent legionellae. Indeed, it has demonstrated the high virulence of environmental *Legionella pneumophila* serotype 1 isolates towards amoebae, a natural host in water spring; this is known to enhance *Legionella* virulence trait towards human macrophages. Moreover, it has shown the persistence capacity of *Legionella pneumophila* species in such an ecosystem. Finally, it also pointed out the biodiversity of *Legionella pneumophila* in their natural environment.

Methods

Environmental isolates

Glass slides were dipped into the contaminated spring S of a French Alpine thermal spa. After 15 days of incubation, the glass slides were covered with natural biofilms. These biofilms were harvested by scraping the glass slides and resuspended in 5 mL sterile water. Then, these suspensions were submitted to ultrasounds during 1 min in order to break up the aggregates formed by biofilms and to release bacterial cells. Bacterial suspensions were treated at 50°C during 30 min, and then submitted to an acidic treatment during 5 min by addition of 200 mM KCL/HCl pH 2.0. Aliquots (100 µL) were spread on agar GVPC medium (Oxoid, France) containing L-cysteine, iron pyrophosphate, ACES, charcoal and antibiotics (polymixin B, vancomycin, cicloheximide). After a 5 day-period incubation at 37°C, bacterial colonies with a fritted glass appearance were picked up and isolated again on GVPC. New independent colonies were picked

up and suspended in cryotubes containing beads and bacterial preservers for storing at -20°C .

The *Acanthamoeba castellanii* strain is an environmental isolate provided by F. Pernin (Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques - Faculté de pharmacie - Université Lyon 1, Lyon, France).

Reference bacterial strains

Reference strains obtained from the National Centre of *Legionella* (Bron, France) were used as controls in different assays: *L. pneumophila* serogroup 1 (Lens, Paris, Lorraine), *L. pneumophila* ATCC 35096 (sg 8) and ATCC 33155 (sg 3), *L. anisa* G12108, *L. longbeachae* ATCC 35096, *L. micdadei* ATCC 33218 and *L. taurinensis* ATCC 700508. The *dotA* mutant is derived from the strain Lens and shows a severe defect of virulence and cytotoxicity [19]. Routinely, *Legionellae* were grown on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar (Oxoid, France) or in BYE liquid medium. *E. coli* DH5 α was cultivated on Lysogeny Broth (LB) agar medium at 37°C and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 was grown at 30°C on M17 agar medium [24].

Serotyping of *Legionellae*

Legionella isolates were identified by polyclonal antisera coupled to latex-beads. Firstly, the *Legionella* latex test from Oxoid (DR0800M) allowed a separate identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and serogroups 2–14, and the identification of seven non-*pneumophila* species: *L. longbeachae* 1 and 2, *L. bozemanii* 1 and 2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei* and *L. anisa*. Secondly, the 15 monovalent latex reagents prepared by bioMérieux allow the separate identification of 15 serogroups of *L. pneumophila* (bioMérieux, Craponne, France) [25].

In situ assay of catalase activity

The presence of bacterial catalase activity was detected using H_2O_2 as the substrate. A bacterial colony was picked up with a sterile loop and diluted into a 15 μL drop of 10% (vol:vol) H_2O_2 , loaded on an empty Petri dish. The rapid formation (in a few seconds) of oxygen bubbles indicates a positive result. *E. coli* DH5 α was used as the positive control (Cat⁺) and *Lactococcus lactis* IL1403 as the negative one (Cat⁻).

Molecular identification and DNA amplification by PCR

Molecular markers used in this study were the following genes: *16S rRNA*, *mip*, *lpg1905*, *lpg0774* and *wzm* (Table 3). A soluble bacterial lysate containing the total DNA was prepared as following; a bacterial suspension was prepared in 40 μL of sterile water, treated at 90°C for 15 min, and centrifuged 13,000 rpm for 8 min. The supernatant corresponding to the bacterial lysate was kept and stored at -20°C .

DNA amplification was performed with the 2 \times PCR Master Mix DNAzyme II (Finnzymes) containing 0.04 U/ μL DNAzymeTM II DNA polymerase, 400 μM of each dNTP, 3 mM MgCl_2 , 100 mM KCl and 20 mM Tris-HCl pH 8.8 (and stabilizers). The PCR mixture (25 μL) contained the 2 \times PCR Master Mix DNAzyme II (12.5 μL), 10 mM forward and reverse appropriate primers (1.0 μL each) (Table 1), and the bacterial lysate (8.0 μL). Amplification of DNA was performed in a Ep-gradient Mastercycler (Eppendorf) at initial denaturation of 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min with a final extension at 72°C for 8 min. Reactions mixtures were then held at 10°C . 8 μL of the PCR amplification mixture was analyzed by gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and photographed under U.V. transillumination.

Purification and sequencing of PCR *mip* products

PCR *mip* products were analyzed by gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel (50 mL) stained with 3 μL SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). DNA products were visualized under blue U.V. transillumination and picked up with a band of agarose gel. Then PCR products were purified using GeneCleanR Turbo Kit (MP Biomedicals) according to the manufacturer's instructions. Finally, the purified PCR products were suspended in 10 μL sterile water and then stored at -20°C . Sequencing was performed by GATC Biotech SARL (Mulhouse, France).

PFGE subtyping

Legionella isolates were subtyped by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) method as described previously [26]. Briefly, legionellae were treated with proteinase K (50 mg/mL) in TE buffer (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 8) for 24 h at 55°C , and DNA was digested with 20 IU of SfiI restriction enzyme (Boehringer Mannheim, Meylan, France) for 16 h at 50°C . Fragments of DNA were separated in a 0.8% agarose gel prepared and run in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.3) in a contour-clamped homogeneous field apparatus (CHEF DRII system; Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) with a constant voltage of 150 V. Runs were carried out with increasing pulse times (2 to 25 s) at 10°C for 11 h and increasing pulse times (35 to 60 s) at 10°C for 9 h.

Then, the gels were stained for 30 min with a ethidium bromide solution and PFGE patterns were analyzed with GelComparII software (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium).

Quantification of *Legionella* virulence towards the amoeba *Acanthamoeba castellanii*

Legionellae were grown on BCYE agar and *A. castellanii* cells in PYG medium (Moffat and Tompkins, 1992) for

Table 3 Couples of primers used in this study

Gene	Primer name	Primer sequence	Amplicon size (pb)	Reference
16S <i>RRNA</i>	Leg225	5' AAGATTAGCCTGCGTCCGAT	654	[18]
	Leg858	5' GTCAACTTATCGCGTTTGCT		
<i>mip</i>	<i>mip</i> Lesens	5' ATGAAGATGAAATTGGTGACTGCAG	607	[11]
	<i>mip</i> Lesrev	5' CAACGCTACGTGGGCCATA		
<i>lpg1905</i>	<i>lpg1905</i> sens	5' TTGCCTAAAACCTACCACAGAA	528	[18]
	<i>lpg1905</i> rev	5' ATGCCGCCAAAATATACC		
<i>lpg0774</i>	<i>lpg0774</i> sens	5' TGCTAACAACTACTATCCCAA	155	[18]
	<i>lpg0774</i> rev	5' GTTTCAATAAAAGCGTGCTCT		
<i>wzm</i>	<i>wzm</i> sens	5' ATGACCTCAATATCTCAAAAACCTCAG	833	[11]
	<i>wzm</i> rev	5' TTATGCTCCATGTGATGAAATGC		

five days at 30°C prior to infection. *A. castellanii* cells were first seeded in plates of 24 multiwell to a final concentration of 5×10^6 cells per ml in PY medium (PYG without glucose). Plates were incubated during two hours at 30°C to allow amoeba adhesion. Then, *Legionellae* were added to an MOI ("multiplicity of infection") of 5 (in duplicate). In order to induce the adhesion of bacterial cells to the monolayer of amoeba cells, plates were spun at $2000 \times g$ for 10 min and incubated for 1 h at 30°C. Non-adherent bacteria were removed by four successive washings of PY medium. This point was considered as the initial point of infection (T0) and the plates were incubated at 30°C. Extracellular cultivable bacteria released from amoebae were quantified at 1 day and 2 days post-infection as follows. Aliquots (100 µL) of the supernatants were taken and diluted in sterile water to the final 10^{-6} dilution. Aliquots (3 µL) of the serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) were immediately spotted to the surface of agar BCYE plates. Independent bacterial colonies of serial dilutions were numbered after 5 days at 30°C.

In the co-infection experiment, the same cells amount of each strain was added to achieve a final MOI of 5. Extracellular bacteria (10^{-5} and 10^{-6} dilutions) were plated on BCYE agar, 48 h post-infection. Independent bacterial colonies were picked-up after 3 days at 30°C to perform a PCR analysis.

Cytotoxicity to *Acanthamoeba castellanii*

To quantify the viable *A. castellanii* cells remaining after infection with *Legionellae* (MOI 5), a monolayer of amoebae cells at the final concentration of 1×10^6 cells per ml in a 96 multiwell plate was washed (fourfold) with PY and then treated with 10% Alamar blue (Invitrogen). Cytotoxicity of each *Legionella* strain was tested in triplicate. After an overnight incubation at 30°C, measurements were performed at the optical density (OD) of 570 nm and corrected for background at OD_{600 nm} with a µQuant microplate reader (Biotek Instruments Inc., Winooski, USA) The relative degree of amoeba mortality corresponds

to the cytotoxicity and was expressed as the ratio of the OD value of infected monolayer to that of the uninfected one as following: $[1 - (\text{mean OD value of infected} / \text{mean OD value of uninfected})] \times 100\%$.

Additional files

Additional file 1: PFGE analysis of environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains. *Legionella* DNA samples were digested with SfiI restriction enzyme for 16 h at 50°C. Fragments of DNA were separated in a 0.8% agarose gel prepared and run in 0.5x Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.3) in a contour-clamped homogeneous field apparatus with a constant voltage of 150 V. Runs were carried out with increasing pulse times (2 to 25 s) at 10°C for 11 h and increasing pulse times (35 to 60 s) at 10°C for 9 h.

Additional file 2: Multiple alignment of *mip* sequences from environmental (*mip1*, *mip2* and *mip3*) and clinical *L. pneumophila* sg1 strains. Clinical strains: Lp1Corby (NC009494.2), Lp1 Lens (NC006369.1), Lp1 Paris (NC006368) and Lp1 Philadelphia (AE017354.1).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

ZC isolated the environmental strains, performed serotyping, molecular typing, helped to perform cytotoxicity and virulence experiments and wrote portions of the final manuscript. FF and MR performed the PFGE analysis of the isolates. SJ planned PFGE experiments and helped in the preparation of the final manuscript. DA helped to plan molecular typing and performed cytotoxicity and virulence experiments in *Acanthamoeba castellanii*, wrote large portions of the final manuscript. DF helped to plan isolation and first characterization of strains and helped in the preparation of the final manuscript. CG helped to plan molecular typing, performed cytotoxicity and virulence experiments in *Acanthamoeba castellanii* and prepared the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study is supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université Lyon 1. Z. Chaabna was the recipient of a fellowship from the Axelera Chemical Environmental competitiveness Cluster (LEGIOSECURE program). The authors are grateful to Claire Andréa for skilful technical assistance.

Author details

¹UMR CARRTEL, Université de Savoie-INRA, Le Bourget du Lac F-73376, France. ²Centre de Biologie et Pathologie Est, Centre National de Référence des Légionelles, Bron F-69677, France. ³Université Lyon, INSERM U851,

Université Lyon 1, Lyon F-69008, France. ⁴Université de Lyon, CNRS UMR 5240, Université Lyon1, Villeurbanne F-69622, France.

Received: 24 July 2012 Accepted: 14 January 2013
Published: 28 January 2013

References

- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR: **Legionnaires' Disease.** *N Engl J Med* 1977, **297**(22):1197–1203.
- Nguyen TMN, Illeff D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, Haeghebaert S, Ganiayre FO, Marcel F, Etienne J, et al: **A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers - How far can contaminated aerosols spread?** *J Infect Dis* 2006, **193**(1):102–111.
- Rowbotham TJ: **Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae.** *J Clin Pathol* 1980, **33**(12):1179–1183.
- Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S: **Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(1):458–460.
- Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C: ***Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics.** *Infect Genet Evol* 2009, **9**(5):727–739.
- Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, et al: **Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey.** *J Infect Dis* 2002, **186**(1):127–128.
- Cazalet C, Rusniok C, Bruggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, et al: **Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity.** *Nat Genet* 2004, **36**(11):1165–1173.
- Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C: ***Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa.** *Cell Mol Life Sci* 2007, **64**:432–448.
- Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M: **The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**(1):12–24.
- Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C: **Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control.** *Mol Microbiol* 2010, **76**(1):1–11.
- Merault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Marin M, Brachet E, Aegerter P, Gaillard JL, Etienne J, et al: **Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**(5):1708–1717.
- Bornstein N, Marmet D, Surgot M, Nowicki M, Arslan A, Esteve J, Fleurette J: **Exposure to Legionellaceae at a hot-spring spa - a prospective clinical and serological study.** *Epidemiol Infect* 1989, **102**(1):31–36.
- Molmeret M, Jarraud S, Morin JP, Pernin P, Forey F, Reyrolle M, Vandenesch F, Etienne J, Farge P: **Different growth rates in amoeba of genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a thermal spa.** *Epidemiol Infect* 2001, **126**(2):231–239.
- Bandyopadhyay P, Steinman HM: ***Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the *katB* gene and studies of KatB function.** *J Bacteriol* 1998, **180**(20):5369–5374.
- Bandyopadhyay P, Steinman HM: **Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the *katA* gene and studies of KatA function.** *J Bacteriol* 2000, **182**(23):6679–6686.
- Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, Benson RF, Gorman GW: **Whole-cell peroxidase test for identification of *Legionella pneumophila*.** *J Clin Microbiol* 1984, **19**(2):286–290.
- Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW: **Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**(6):1560–1567.
- Yong SFY, Tan SH, Wee J, Tee JJ, Sansom FM, Newton HJ, Hartland EL: **Molecular detection of *Legionella*: moving on from *mip*.** *Front Microbiol* 2010, **1**:123.
- Ferhat M, Atlan D, Vianney A, Lazzaroni JC, Doublet P, Gilbert C: **The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion.** *PLoS One* 2009, **4**(11).
- Cirillo JD, Cirillo SLG, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS: **Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*.** *Infect Immun* 1999, **67**(9):4427–4434.
- Neumeister B, Reiff G, Faigle M, Dietz K, Northoff H, Lang F: **Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(3):914–919.
- Thacker WL, Wilkinson HW, Benson RF, Brenner DJ: ***Legionella-pneumophila* serogroup-12 isolated from human and environmental sources.** *J Clin Microbiol* 1987, **25**(3):569–570.
- Amaro F, Gilbert JA, Owens S, Trimble W, Shuman HA: **Whole-genome sequence of the human pathogen *Legionella pneumophila* serogroup 12 strain 570-CO-H.** *J Bacteriol* 2012, **194**(6):1613–1614.
- Lamarque M, Aubel D, Piard JC, Gilbert C, Juillard V, Atlan D: **The peptide transport system Opt is involved in both nutrition and environmental sensing during growth of *Lactococcus lactis* in milk.** *Microbiology-Sgm* 2011, **157**:1612–1619.
- Reyrolle M, Ratat C, Lepotier M, Jarraud S, Freney J, Etienne J: **Rapid identification of *Legionella pneumophila* serogroups by latex agglutination.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004, **23**(11):864–866.
- Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, Goulvestre C, Matsiata-Bernard P, Etienne J, Nauciel C: **Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**(8):2652–2655.

doi:10.1186/1471-2180-13-17

Cite this article as: Chaabna et al.: Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa. *BMC Microbiology* 2013 **13**:17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 juin 2012 (21.06.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/080673 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
C02F 1/32 (2006.01) C02F 1/72 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/053008
- (22) Date de dépôt international :
15 décembre 2011 (15.12.2011)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1060620 16 décembre 2010 (16.12.2010) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ARKE-
MA FRANCE [FR/FR]; 420, Rue d'Estienne d'Orves, F-
92700 Colombes (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : PUTOIS,
Tamara [FR/FR]; 5, Allée des Chevreuils, F-74150 Ru-
milly (FR). CHAABNA, Zineddine [DZ/FR]; 7, rue
Favre, F-73000 Chambéry (FR). COTTON-GUITTON-
NEAU, Sylvie [FR/FR]; 257, Les Charmettes, F-73100
Pugny (FR). FONTVIEILLE, Dominique [FR/FR]; 4517,
Route du Tremblay, F-73290 La Motte Servolex (FR).
BAYLE, Xavier [FR/FR]; 4, Rue Gaston Lhoustau, F-
30420 Calvisson (FR). ZYDOWICZ, Philippe [FR/FR];
12 rue Branly, F-69800 Saint-Priest (FR).
- (74) Mandataire : PRAS, Jean-Louis; Arkema France (DRD-
DPI), 420, rue d'Estienne d'Orves, F-92705 Colombes Ce-
dex (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Déclarations en vertu de la règle 4.17 :
- relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un
brevet (règle 4.17.ii)
- Publiée :
- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues (règle 48.2.h)

(54) Title : METHOD AND DEVICE FOR DISINFECTING WATER

(54) Titre : PROCÉDÉ ET APPAREILLAGE POUR LA DÉSINFECTION DE L'EAU

(57) Abstract : The invention relates to a method for controlling the growth of biofilms or for reducing the biofilms formed on the inner wall of the pipes of a water circuit, including: injecting hydrogen peroxide into the water circulating in the circuit; and irradiating said water with ultraviolet radiation. The invention also relates to a system for controlling the growth of biofilms or for reducing the biofilms formed on the inner wall of the pipes of a water circuit suitable for implementing said method, as well as to a facility including a water circuit and such a system. The invention further relates to a method for disinfecting water and to the use of a method for disinfecting water for controlling the growth of biofilms or for reducing the biofilms formed on the inner wall of the pipes of a water circuit.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé pour maîtriser la croissance des biofilms voire réduire les biofilms formés sur la paroi interne des conduites d'un circuit d'eau, comprenant : l'injection de peroxyde d'hydrogène dans l'eau circulant dans le circuit; et l'irradiation de cette eau par un rayonnement ultraviolet. L'invention concerne également un système de maîtrise de la croissance des biofilms voire de réduction des biofilms formés sur la paroi interne des conduites d'un circuit d'eau adapté à la mise en œuvre de ce procédé, ainsi qu'une installation comprenant un circuit d'eau et un tel système. L'invention concerne également un procédé de désinfection d'eau et l'utilisation d'un procédé de désinfection d'eau, pour maîtriser la croissance des biofilms voire pour réduire les biofilms formés sur la paroi interne des conduites d'un circuit d'eau.



WO 2012/080673 A1