

- REVUE GÉNÉRALE -

Y a-t-il des infections bactériennes opportunistes
transmises par les eaux d'alimentation ?

ARE THERE OPPORTUNISTIC BACTERIAL INFECTIONS
FROM DRINKING WATER ?

HENRI LECLERC

Faculté de Médecine de Lille et Institut Pasteur de Lille, France.
Email : hleclerc@univ-lille2.fr

Résumé

La présence de certaines bactéries dites « pathogènes opportunistes » dans les eaux d'alimentation est sujet à débat. Il s'agit des Legionella, de P. aeruginosa, des Aeromonas et des bactéries du complexe M. avium. L'analyse des données montre que le risque de légionellose est présent et qu'il est plus élevé pour les populations sensibles, en particulier en milieu hospitalier. Les établissements de santé doivent définir des plans de sécurité sanitaire pour contrôler les risques inhérents à ces populations spécifiques. Il n'existe aucun lien significatif entre les bactéries HPC de l'eau d'alimentation et des infections entériques. Les eaux minérales naturelles ont un statut particulier parmi les eaux d'alimentation. Les populations bactériennes qui se développent naturellement dans ces eaux sont dénuées de pouvoir pathogène.

Mots clés : *évaluation des risques, bactéries opportunistes, HPC (Heterotrophic Plate Count), eau d'alimentation, eau minérale naturelle.*

Abstract

This paper reviews the epidemiological evidence concerning whether HPC bacteria pose a risk to human health. We first consider epidemiological studies that have attempted to identify associations between gastro-intestinal illness in

humans and some specific bacteria named « opportunistic pathogen bacteria » that can be considered as heterotrophic bacteria. There is no evidence of association of strains of *P. aeruginosa*, *Aeromonas* and *M. avium* complex with enteric infection through the water-borne route among the general population. However the public health significance of inhalation exposure to some *Legionella* has been demonstrated. Health care facilities including hospitals, health centres, dialysis centres and dental consulting room, representing a general area of concern for infection control because populations at increased risk, should have general water safety plans, being part of their infection control strategy. Such plans should be apply to control of external contamination by *P. aeruginosa*, and *Legionella*. We next consider those studies that have investigated the epidemiology of HPC bacteria. The strong evidence from these studies is that there is no such association.

Natural mineral water is typical example of not vulnerable groundwater, i.e., not under the direct influence of surface water. Contrasting with treated drinking water, natural mineral waters cannot be subjected to any type of disinfection that modifies or eliminates their biological components, and they always contain heterotrophic bacteria (HPC) that are primarily a natural component of these waters. Overall experimental and epidemiological data show that autochthonous bacteria of natural mineral waters have never brought about detectable pathological disorders in human or animals and, in vitro, are incapable of directly damaging human cells in tissue culture. Since the existence of european regulations dating from 1980 (EC, 1980), no outbreak or single case of disease due to the consumption of natural mineral water has been recorded in the literature, or by the health authorities of the countries within the European Community.

Key-words: risk assessment, opportunistic bacteria, HPC (Heterotrophic Plate Count), drinking water, natural mineral water.

INTRODUCTION

L'histoire des épidémies microbiennes d'origine hydrique, telle qu'elle apparaît à travers les statistiques américaines (Leclerc et al, 2002), peut être analysée en trois grandes périodes, chacune d'entre elles étant caractérisée par des agents étiologiques spécifiques et par des moyens de prévention appropriés (traitements et contrôle).

(i) La première et plus ancienne période a été marquée par des épidémies dues aux bactéries entéropathogènes telles que les *Salmonella*, les *Shigella*, *Vibrio cholerae*. L'instauration de traitements adaptés, comprenant en particulier la filtration et la chloration dès les années 1900, s'est révélée d'une remarquable efficacité, faisant régresser les épidémies de façon spectaculaire. Le recours à la chloration a été considéré, à juste titre, comme l'un des événements marquants dans l'histoire de la prévention des maladies infectieuses. Les quelques épidémies d'origine bactérienne qui surviennent encore de nos jours peuvent donner lieu à

deux remarques: (1) la plupart sont consécutives à des incidents techniques ou à des accidents qui ne remettent évidemment pas en cause la conception des traitements; (2) l'apparition de nouveaux agents étiologiques comme les *E. coli* entéro-hémorragiques (*E. coli* O157: H7) ou les *Campylobacter*, traduit l'apparition d'une certaine pression épidémique (germes émergents), relativement localisée du point de vue géographique au continent Nord Américain dans le cas d'*E. coli* O157:H7, initialement au Royaume Uni dans le cas des *Campylobacter*. Ces espèces sont aussi caractérisées par un pouvoir infectieux élevé, quelques centaines de germes suffisant à provoquer la maladie alors que les doses infectieuses des agents traditionnels comme les *Salmonella* sont de l'ordre de 10^7 - 10^9 (Leclerc et al, 2002), celles de *Vibrio cholerae* d'au moins 10^8 (Levine et al, 1988).

Le rôle des traitements a été certes indispensable pour éliminer ou détruire les bactéries nuisibles mais il fallait aussi leur associer des moyens de contrôle pour en tester l'efficacité. L'usage des marqueurs ou indicateurs (indicateurs de contamination fécale – indicateurs de qualité), représentés en particulier par les coliformes, s'est révélé tout autant indispensable et complémentaire. L'absence des indicateurs fécaux (*E. coli*) dans l'eau analysée traduisait l'absence de tout autre bactérie entéropathogène. On a pu se rendre compte, par la suite, que ces indicateurs de signification sanitaire étaient aussi des indicateurs d'efficacité du traitement. Au cours de cette première période la majorité des épidémies était d'origine bactérienne et il était difficile d'imaginer l'existence d'autres agents, les méthodes de diagnostic étant, à cette époque, ciblées essentiellement sur les bactéries.

(ii) La seconde période est celle de l'émergence, à partir des années 1940-50 (parallèlement à la disparition des épidémies bactériennes), d'épidémies de gastro-entérite ou de diarrhée chez lesquelles l'agent étiologique était indéterminé (non bactérien). Dans la plupart d'entre elles, les données cliniques et épidémiologiques paraissaient en faveur d'infections à virus de type Norwalk. Parmi les virus reconnus comme entéropathogènes, les calicivirus dont font partie les virus de Norwalk et Norwalk-like, se sont révélés en effet les plus fréquemment responsables. Au cours de cette même période et plus précisément à partir des années 1970 les protozoaires (*Giardia* et *Cryptosporidium*) font leur apparition et deviennent la cause la plus commune des maladies hydriques aux USA.

Trois facteurs principaux ont favorisé l'émergence de ces nouveaux agents (Leclerc et al, 2002): le premier est la résistance au traitement chloré. De nombreux exemples d'isolement de virus entéropathogènes dans les eaux traitées ont été décrits. La résistance des protozoaires à la chloration est élevée avec les *Giardia*, exceptionnelle dans le cas des *Cryptosporidium*. Le deuxième facteur concerne le contrôle du traitement. Les indicateurs bactériens en usage étaient en effet incapables de représenter des agents (virus ou protozoaires) de nature, de caractéristiques et donc d'évolution différentes dans les eaux brutes ou les eaux traitées. Ces indicateurs bactériens étaient éliminés par les traitements adaptés à base de chlore tandis que les virus et surtout les protozoaires persistaient. Enfin le troisième élément favorable est que les doses infectieuses de ces agents sont relativement faibles de l'ordre de 1-10 particules infectieuses avec les virus, 10-100 cystes ou oocystes dans le cas des protozoaires. Il en résulte que leur trans-

mission est possible aussi bien sous forme épidémique, apparente et comptabilisable, que sous forme endémique beaucoup plus difficile à définir et à évaluer.

La survenue de ces nouveaux agents infectieux, les protozoaires, et dans une moindre mesure, les virus, a modifié totalement notre conception traditionnelle de la maîtrise de la qualité des eaux de consommation basée sur les multiples barrières que l'on pouvait mettre en œuvre, les deux principales d'entre elles étant le traitement d'une part et le contrôle de l'efficacité du traitement d'autre part. L'extrême résistance des protozoaires comme les *Cryptosporidium* et l'absence d'indicateurs capables de révéler leur présence dans les eaux traitées font que le «risque 0» devient un objectif irréalisable. La politique qui est alors préconisée dans un certain nombre de pays et qui a été initiée aux USA consiste à réduire, par le traitement, le taux de protozoaires de l'eau brute de telle sorte qu'il parvienne à un niveau acceptable dans l'eau traitée. La définition du niveau acceptable (gestion des risques) découle des données fournies par l'évaluation des risques : connaissance des doses infectieuses à partir d'études expérimentales chez les volontaires, établissement de modèles dose-réponse (Haas, 1983, Dupont et al, 1995). Aux États Unis, l'agence pour la protection de l'environnement (EPA) a proposé que le risque annuel de 10^{-4} (1 infection pour 10000 consommateurs par an) pouvait être acceptable dans le cas des agents pathogènes qui échappent au traitement et à la surveillance traditionnelle par les indicateurs. Cette conception qui semble s'imposer, parce qu'elle représente la meilleure alternative possible actuelle, comporte encore de larges incertitudes qui tiennent aux notions de doses infectieuses (peu de données), aux modèles théoriques dose-réponse, complexes et nombreux, à la mise en évidence de la viabilité et de l'infectiosité des oocystes etc. La plus importante de ces incertitudes est due à la difficulté voir l'impossibilité des méthodes à détecter un faible nombre de cystes ou d'oocystes. Ce manque de sensibilité ne permet pas de définir avec précision l'efficacité de l'élimination, donc le taux d'exposition.

(iii) La troisième période, celle de l'actualité présente, pourrait être un retour à des risques bactériologiques nouveaux alors que persiste, bien évidemment, les risques (virus et protozoaires) de la deuxième période. Cette situation concernerait certaines bactéries de l'environnement, capables de survivre et de se multiplier dans les milieux aquatiques naturels (eaux douces), et capables aussi dans certaines circonstances, d'infecter l'homme et de produire une maladie (pathogènes opportunistes). Ces bactéries peuvent pénétrer dans les réseaux d'eau d'alimentation pour s'y développer notablement, d'autant plus qu'ils rencontreront des conditions favorables (température, matière organique). Comme précédemment le «risque 0» c'est-à-dire l'absence de ces agents dans les eaux est illusoire puisqu'en permanence, à partir des eaux brutes, ilsensemencent le réseau et peuvent subsister ou se multiplier, en particulier dans les biofilms. Le problème actuellement majeur est celui des *Legionella* responsables des légionelloses, des pneumopathies graves, de mortalité importante (15-20 %) et transmises par l'eau contaminée. Cette maladie élargit le cadre épidémiologique des infections liées aux eaux d'alimentation, réservé jusqu'alors aux germes entéropathogènes ou transmis par voie digestive, la légionellose étant transmise par voie aérienne (aérosols contaminés).

Les infections sont associées le plus souvent aux usages de l'eau de distribution (eau chaude sanitaire, climatisation, tours d'aéro-refroidissement, etc.) plus rarement à l'eau d'alimentation elle-même. A côté de ce risque essentiel un débat s'est engagé autour de plusieurs autres groupes de bactéries pathogènes opportunistes dont les principales sont l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, les *Aeromonas* et les bactéries du complexe *Mycobacterium avium*.

Certaines études épidémiologiques ont aussi laissé entendre que les bactéries dénombrées dans les eaux d'alimentation sous le nom de HPC (Heterotrophic Plate Count) pouvaient être impliquées dans des infections opportunistes. Avant d'aborder l'analyse du rôle infectieux possible pour l'homme de ces bactéries qui vivent dans les eaux, nous rappellerons brièvement ce que l'on entend par bactéries pathogènes et pathogènes opportunistes. Nous discuterons enfin de la nécessité, en ce qui concerne l'évaluation des risques, de distinguer entre les eaux d'alimentation distribuées et traitées et les eaux d'alimentation provenant d'aquifères souterrains, protégés de toute contamination (non vulnérables) et qui ne font pas l'objet de traitement comme le sont, par exemple, les eaux minérales naturelles.

QU'EST CE QU'UNE BACTÉRIE PATHOGÈNE OPPORTUNISTE

Il y a plus d'un siècle Pasteur et Koch ont clairement mis en évidence le pouvoir pathogène des microorganismes, établissant qu'un pathogène est un membre d'une espèce microbienne et que la virulence définit certaines propriétés spécifiquement dangereuses de ce membre. Du point de vue historique les microorganismes pathogènes étaient ceux qui, invariablement, étaient capables de causer une maladie. Le pouvoir pathogène et la virulence étaient considérés comme des propriétés intrinsèques de certains microorganismes. Ce concept de pathogénèse s'affirme de façon radicale avec les postulats de Koch. Ceux-ci établissent les bases de «la théorie des germes» en plaçant l'entière responsabilité du pouvoir pathogène sur le microbe. Dans les années récentes, cette vue est confortée par le fait que de nombreux gènes indispensables à la virulence des bactéries sont compris dans de larges segments d'ADN décrits sous le nom d'«**îlots de pathogénicité**» (PAIs), impliquant que les bactéries qui acquièrent ces gènes deviennent virulentes (Hacker and Kaper, 2000). Ces îlots de pathogénicité sont présents dans les génomes de microorganismes pathogènes mais absents des microorganismes non pathogènes de la même espèce ou d'espèces étroitement apparentées. Ils sont fréquemment flanqués de petits segments d'ADN, souvent associés à des gènes de transfert ARN, souvent porteurs de gènes codant pour des facteurs de mobilité, enfin souvent situés dans des régions instables d'ADN. Ces déterminants génétiques permettent le transfert horizontal des îlots de pathogénicité, des bactéries qui les possèdent, à celles qui ne les possèdent pas. De nombreux membres de la famille des *Enterobacteriaceae* comme les *Escherichia coli*, les *Salmonella*, les *Shigella* et les *Yersinia* sont responsables d'infections intestinales par des facteurs de virulence encodés sur des PAIs. L'exemple le plus fameux de

ces PAIs mobilisables a été décrit avec les souches de *Vibrio cholerae*. En effet tout un faisceau de données récentes suggèrent que les principaux gènes de pathogénicité des souches toxigènes de *Vibrio cholerae* (sérogroupe O1 et O139) sont groupés dans plusieurs régions chromosomiques (gène CTX et îlot de pathogénicité TCP) qui peuvent être propagées horizontalement à des souches environnementales de *Vibrio cholerae* non O1 et non O139 par conversion lysogénique (Faruque et al, 1998).

Pourtant, depuis que la théorie des germes responsables des maladies a été acceptée, il est apparu assez rapidement qu'elle ne pouvait expliciter toutes les situations et que le pouvoir pathogène ne pouvait être considéré comme un caractère invariant et stable de la plupart des microorganismes. A titre d'exemple il suffit de citer les infections acquises par les malades au cours de leur hospitalisation (infections nosocomiales) lesquelles ne résultent pas de l'acquisition de pathogènes «sensu stricto» c'est-à-dire pourvus de caractères de virulence spécifique. Elles sont causées, en effet, par des microorganismes commensaux des flores cutané-muqueuses du patient (staphylocoques coagulase négative, entérobactéries diverses, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.*, *Candida spp.*, etc.) ou par des bactéries de l'environnement naturel comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, ou encore par des bactéries multirésistantes sélectionnées au cours des traitements antibiotiques telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline, *P. aeruginosa* résistant à la ticarcilline, etc. Les infections nosocomiales, la légionellose, les infections consécutives au développement d'un état d'immuno-dépression chez les sidéens sont autant d'exemples montrant que les notions traditionnelles de pathogénicité et de virulence ne sont pas suffisantes pour expliquer totalement les interactions et les effets pervers que le monde microbien peut exercer sur l'homme. C'est la raison pour laquelle, à la suite de la théorie des germes, s'est développé un concept beaucoup plus large, initialement exprimé par le microbiologiste américain Theobald Smith (1934) puis largement développé depuis (Isenberg, 1988), concept selon lequel l'hôte lui-même et son état réactionnel physiologique et immunologique peuvent concourir aux manifestations cliniques consécutives à une exposition infectieuse. Le degré d'immuno-dépression peut influencer largement l'étendue des complications infectieuses. En bref la maladie infectieuse serait explicitée par une cascade d'événements et de signes cliniques auxquels participeraient à la fois le microorganisme infectant et l'individu infecté. Plus récemment, Casadevall et Pirowski (1999, 2000) ont formalisé une théorie intégrée de la pathogénèse qui fait appel aux contributions de l'hôte et à celles du microorganisme. Ce concept repose sur trois postulats: (1) l'acquisition d'un microbe par un hôte suscite chez celui-ci certaines altérations tissulaires qui déclenchent une réponse immune spécifique; (2) à la naissance l'être humain n'est porteur d'aucun microbe et l'acquisition initiale d'une flore microbienne est le résultat d'une infection; (3) l'interaction hôte-microbe est caractérisée par des troubles biologiques et des manifestations cliniques de nature variée. La constance, le type et l'importance des troubles biologiques et cliniques constitueraient la base d'un nouveau lexique de la pathogénèse microbienne comme on le voit sur la figure 1.

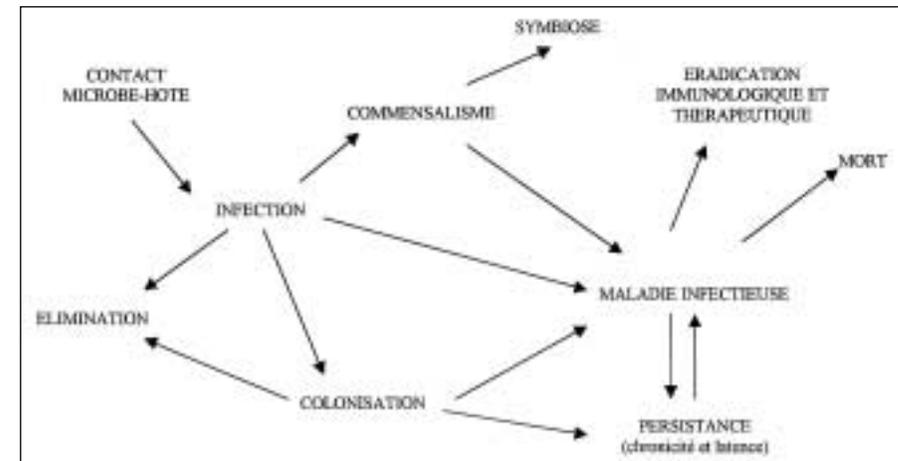


Figure 1 : Interactions hôte-microbe (d'après Casadevall et Pirowski, 2000).

Infection : entrée du microbe chez l'hôte; **Commensalisme :** état infectieux caractérisé par l'absence de trouble et l'absence de signe clinique; **Colonisation :** état infectieux allant de l'absence de trouble à des troubles significatifs; **Persistance :** état infectieux au cours duquel la réponse de l'hôte n'élimine pas le microbe, les troubles restant continus dans le temps; **Maladie infectieuse :** manifestation clinique des troubles qui résultent de l'interaction microbe-hôte.

(Remarque: la tradition et l'usage font que le terme d'infection est souvent employé comme synonyme de maladie infectieuse).

Ainsi il n'est pas facile ni opportun d'établir une distinction absolue entre les microorganismes pathogènes que certains qualifient de «vrais» ou de «réels» et qui, selon les réactions de l'hôte, ne sont en fait que des pathogènes «potentiels» et les innombrables microorganismes des flores naturelles dites «endogènes» (Savage, 1977) liées à leurs habitats respectifs (flore cutané-muqueuse, flore intestinale, flore vaginale, etc.) qui, par définition, ne sont pas pathogènes et qui, pourtant, à l'occasion d'un déficit immunitaire localisé ou général, peuvent produire des troubles dans l'organisme qui les héberge. Ces flores commensales peuvent être aussi parasitées, au cours des multiples contacts de l'homme avec son environnement, par des microbes provenant de l'air, de l'eau, des aliments, etc. qui ont la capacité de se fixer voir de se multiplier sur les surfaces corporelles exposées (peau et muqueuses). Le terme de «saprophytes» (qui vivent sur la matière organique en décomposition) a été souvent utilisé pour les caractériser et pour les opposer aux pathogènes «vrais», considérant qu'ils étaient, par définition, comme dans le cas des bactéries commensales, dénués de pouvoir pathogène. Ici encore, la distinction entre saprophytes et pathogènes ne peut être absolue. Certaines bactéries telles que les *Legionella* ou *Pseudomonas aeruginosa* qui vivent dans les milieux aquatiques naturels en apportent la preuve. C'est dans ce contexte que certaines infections qui surviennent avec une particulière fréquence chez les personnes immunodéprimées ont été appelées «infections opportunistes». Un microorganisme opportuniste, comme l'a défini von Graevenitz (1977) est celui qui utilise l'opportunité offerte par des moyens de défense affai-

blis de l'hôte pour occasionner une infection. Les microorganismes opportunistes causent habituellement des infections plus sévères et/ou plus fréquentes chez les personnes immunodéprimées que chez les individus en bonne santé. Pour considérer qu'un microorganisme donné est un pathogène opportuniste de l'eau d'alimentation, il apparaît nécessaire que quelques conditions soient remplies, conformément aux données de Duncan (1988) et Allen et al (2002). (1) Il existe une histoire clinique de la maladie, causée par le germe en question à la suite de la consommation de l'eau ou de son usage; (2) les données épidémiologiques montrent à l'évidence que l'eau, plutôt que les aliments ou d'autres vecteurs, est à l'origine de la maladie; l'évidence épidémiologique pourraient découler des critères de causalité, définis par Bradford-Hill (1965). Ces conditions pré-établies font que (3) le microorganisme doit être en concentration suffisante dans l'eau et possède les facteurs de virulence reconnus; (4) ce microorganisme n'est pas facilement détruit ou éliminé par les traitements et reste viable et infectieux lorsqu'il survit; (5) il existe des méthodes validées et évaluées pour mettre en évidence la présence du microorganisme et pour en estimer le nombre et le pouvoir infectieux. Tous ces critères sont respectés avec le protozoaire pathogène opportuniste *Cryptosporidium parvum*, avec la bactérie *Legionella pneumophila*, la plupart d'entre eux, sinon la totalité, ne sont pas remplis dans le cas des *Aeromonas*, comme nous le verrons plus loin (section V).

L'aspect fondamental sur lequel il faut insister est que la pathologie opportuniste est avant tout une pathologie hospitalière. Les infections opportunistes sont essentiellement des infections nosocomiales, c'est-à-dire contractées dans une structure de soins ou acquises en milieu hospitalier. Leur survenue et leur fréquence est liée à un certain nombre de facteurs de risque caractéristiques des malades hospitalisés (Moine, 2002): gravité de la maladie, pathologie sous-jacente, prise en charge de patients de plus en plus fragiles, de plus en plus âgés, traitements de plus en plus agressifs des pathologies néoplasiques, interventions chirurgicales à haut risque, traitements immunosuppresseurs, fréquentation de plus en plus élevée des services de réanimation et durée du séjour, dépression immunitaire, colonisation des muqueuses, antibiothérapie à large spectre, etc. Le cadre hospitalier de ces populations «à risque» tend à s'élargir, un certain nombre de patients immunodéprimés pouvant être soignés à domicile (traitements ambulatoires). Le risque de développer une infection opportuniste et nosocomiale est donc lié directement à l'état d'immunodépression des malades. Il n'en faut pas pour autant confondre systématiquement infections opportunistes et infections nosocomiales. Si la plupart des infections nosocomiales sont des infections opportunistes «difficilement évitables» puisque étroitement dépendantes du patient et de sa fragilité, il existe des infections nosocomiales «évitable» et souvent non admissibles dans la mesure où elles surviennent chez des patients sans risque apparent; un exemple typique est l'infection du site opératoire chez un patient à faible risque (adulte, chirurgie courte et programmée, absence de pathologie associée) (Moine, 2002).

Le rôle de l'hôte et des différents facteurs physiologiques ou pathologiques qui peuvent affaiblir ses défenses immunitaires apparaît ainsi de plus en plus

significatif dans l'émergence des infections dites opportunistes, d'où la tendance actuelle à vouloir cataloguer et classer en catégories les groupes de populations qualifiées de «sensibles» ou encore «à risque». Cet objectif présente un intérêt certain pour gérer les risques inhérents à la consommation de l'eau. Si le risque ne concerne que certaines des populations sensibles, il leur sera conseillé de ne pas consommer ou de prendre des mesures de prévention adaptées. On évitera ainsi un arrêt total de la distribution, une alternative qui comporte aussi des risques (celui par exemple, pour les personnes peu ou mal informées, de recourir à des sources non contrôlées et peut-être plus dangereuses). Il est classique de distinguer certains groupes sensibles dans la population générale (Gerba, 1996): **femmes enceintes** et **nouveaux-nés, jeunes enfants** (jusqu'à 5 ans) et **personnes âgées**. Les taux de mortalité (pour 100 000 habitants) sont nettement plus élevés chez les jeunes enfants et le vieillard comparativement à l'adulte jeune. Il est habituel de parler de l'«immaturité» du système immunitaire du nouveau-né sans que ce concept puise d'ailleurs être parfaitement précisé. L'âge entraîne un déclin fonctionnel du système immunitaire, éventuellement associé à un dysfonctionnement marqué par l'apparition de phénomènes auto-immuns. Enfin, il est un fait d'observation clinique courante que les infections microbiennes sont plus graves et plus fréquentes au cours de la grossesse, en particulier lors du 3^e trimestre de la gestation. Cette sensibilité globale connaît pourtant des variantes singulières selon les groupes. Ainsi les jeunes enfants sont plus particulièrement sensibles aux infections entériques (malnutrition et pays en voie de développement); les personnes âgées sont également touchées. Par contre, la légionellose qui affecte surtout les personnes âgées, n'a jamais été observée chez le jeune enfant. A côté de ces facteurs d'ordre physiologique tels que l'âge, la grossesse ou l'état nutritionnel de l'hôte qui peuvent intervenir en affaiblissant le système immunitaire, de nombreux états pathologiques rendent l'hôte plus sensible aux infections: insuffisance respiratoire, insuffisance cardiaque, diabète, intoxication alcoolique ou tabagique, drogue, traumatismes graves, etc. Il est particulièrement difficile d'établir une classification dans ce domaine dans la mesure où l'objectif est la prévention du risque (gestion du risque) et du fait que, dans chaque catégorie considérée, la sensibilité et donc le risque est d'ordre strictement individuel. Si l'on considère le risque lié à la consommation d'eau potable certains groupes de patients devraient être plus particulièrement pris en considération. C'est le cas des **sidéens** qui payent un lourd tribut aux infections microbiennes. Dans la fameuse épidémie de Milwaukee due à l'eau d'alimentation (Leclerc et al, 2002), la plupart des cas mortels de cryptosporidiose ont concerné les sidéens. Dans certains services hospitaliers, comme ceux d'**onco-hématologie** ou chez les **transplantés** (greffes de rein, foie, cœur, poumons, pancréas...) les malades peuvent être affectés de déficit immunitaire extrême. L'administration, chez ces malades, de drogues immunosuppressives indispensables, favorise l'éclosion des infections microbiennes de toute origine; l'eau et ses divers usages peuvent être une des causes. Le nombre de patients immunodéprimés augmente parallèlement aux progrès de la médecine et récemment, plusieurs auteurs (Engelhart et al, 2001; Glasmacher et al, 2002) ont tenté de formaliser une classification des états d'immunodépression et de proposer des mesures de prévention appropriées à chacune de ces catégories.

Les localisations anatomiques les plus fréquentes des infections opportunistes et/ou nosocomiales sont, toutes populations hospitalières confondues, les infections urinaires, les pneumonies, les infections sur site opératoire, les bactériuries sur catheters, les infections respiratoires hautes. Les infections des voies digestives sont par contre de faible fréquence. Le tube digestif possède en effet son propre système immunologique, le plus ancien et le plus efficace du corps humain (Duncan et Edberg, 1995). Les mécanismes de défense humoraux et cellulaires mis en œuvre par ce système jouent un rôle essentiel (Smith et al, 2001). La flore endogène du patient est à l'origine de la plupart des infections nosocomiales (ex : pneumopathie sous assistance respiratoire mécanique). La transmission croisée se produit par contact de personne à personne. Les microorganismes, en particulier les bactéries multirésistantes, sont aussi manuportés au cours des soins ou à la suite des différents types d'exploration invasifs. Les infections à germes exogènes, d'origine environnementale, sont de loin les moins fréquentes. Leur transmission s'effectue par voie aérienne à partir de l'air contaminé (légionellose, aspergillose). Le cas de la légionellose est typique des infections épidémiques ou sporadiques causées par une eau contaminée. Le rôle de l'eau et de ses usages mérite d'être discuté à propos d'autres bactéries pathogènes opportunistes, souvent responsables d'infections nosocomiales et qui peuvent être transportées dans les eaux d'alimentation.

LES LEGIONELLA

Le genre *Legionella* comprend 42 espèces actuellement décrites (Riffard et al, 1998) parmi lesquelles *L. pneumophila* séro-groupe 1 est la plus fréquemment rencontrée au cours de la maladie humaine. D'autres espèces, également responsables de maladie, ont été plus récemment isolées : *L. micdadei* qui serait la seconde cause de la maladie du légionnaire aux U.S.A, et *L. longbeachae* fréquente en Australie (WHO, 2002a). Les infections à *Legionella* donnent lieu à deux formes de maladie, la légionellose, une pneumonie aiguë, purulente, de mortalité importante (environ 15 %) et la fièvre de Pontiac, une infection fébrile légère, non évolutive et de courte durée. La voie de transmission la plus commune est l'inhalation d'aérosols infectieux pouvant atteindre les alvéoles pulmonaires (diamètre inférieur à 5 µm). L'aspiration après ingestion d'eau contaminée est une autre voie de transmission possible, que certains (Yu, 1993) considèrent comme prédominante. Il n'y a pas de transmission interhumaine. La maladie se présente sous forme épidémique, impliquant le plus souvent l'institution hospitalière (nosocomiale) ou sous forme sporadique dans la communauté (communautaire), ou encore associée au tourisme et aux séjours dans les hôtels.

Les *Legionella* sont des bactéries aquicoles (Leclerc, 2002) qui vivent, survivent et se multiplient dans les milieux aquatiques naturels (eaux de surface et eaux souterraines en communication avec les eaux de surface). Elles sont donc naturellement présentes dans les réseaux d'eau d'alimentation qu'elles contami-

nent et colonisent éventuellement, d'autant plus qu'elles sont relativement résistantes au chlore (plus résistantes qu'*E. coli*). Leur croissance est favorisée par la chaleur. A des températures comprises entre 20 et 50°C, elles vont se multiplier et coloniser de façon privilégiée les réseaux d'eau chaude sanitaire. Deux conditions sont essentielles à la contamination de l'homme : d'une part la température de l'eau favorisant la croissance des bactéries et leur permettant d'atteindre un taux infectieux, d'autre part la production d'aérosols contaminés parvenant jusqu'aux alvéoles pulmonaires des individus en contact. Ces conditions peuvent être remplies avec les tours d'aéro-refroidissement, les condenseurs d'évaporation des conditionneurs d'air, les piscines génératrices d'aérosols, les bains bouillonnants, les douches et dans les établissements de soins avec les humidificateurs, les nébuliseurs ultrasoniques et les différents dispositifs générateurs d'aérosols (ex : assistance respiratoire).

La légionellose est donc véritablement une maladie liée à l'environnement hydrique contaminé par les *Legionella*. C'est une maladie opportuniste, plus fréquente et plus grave chez les patients immunodéprimés et en conséquence plus fréquente en milieu hospitalier où elle revêt une forme épidémique. Elle survient plus particulièrement dans les unités de soins intensifs, chez les transplantés, chez les patients trachéotomisés, au cours des maladies cancéreuses, à la suite des traitements immunosuppresseurs. La maladie peut atteindre également les individus « en bonne santé » de la population générale (infections communautaires). Chez ces personnes les facteurs de risque habituellement cités sont l'âge (supérieur à 50 ans), le sexe (masculin), le tabagisme et l'éthylisme.

On peut s'interroger sur les raisons de la présence, voir de la permanence des *Legionella* dans les réseaux d'eau d'alimentation soumis habituellement à la chloration et qui, en conséquence, devraient être débarrassés de toute bactérie pathogène. Plusieurs facteurs explicatifs peuvent être avancés (Leclerc, 2002) : (1) Il s'agit tout d'abord du mode de vie des bactéries de l'environnement aquatique dont font partie les *Legionella*, c'est-à-dire le **développement en biofilm**. Au contact des surfaces, ces bactéries subissent des changements phénotypiques qui, en particulier, dérèglent la synthèse d'exopolysaccharides. La croissance cellulaire et la production de polysaccharides donne naissance à des microcolonies dispersées dans un réseau muqueux et attachées à la surface colonisée ; c'est le biofilm. De nombreuses espèces peuvent faire partie de ce biofilm, bénéficiant d'avantages réciproques et formant des communautés interactives capables de dégrader plus facilement les constituants organiques de l'eau. La tendance de ces bactéries aquicoles à vivre en biofilm leur procure un autre avantage, celui d'être protégé d'autres organismes prédateurs ou des bactériophages et plus encore de la pénétration des désinfectants comme le chlore qui sera lente ou incomplète. Les *Legionella* trouvent dans les biofilms, des niches écologiques confortables dans lesquelles elles prennent place et prolifèrent (Lee and West, 1991, Fliermans, 1996, Atlas, 1999). (2) Lorsque l'habitat aquatique s'appauvrit en nutriments les bactéries du biofilm (sessiles) peuvent se détacher, se réduisant en minicellules sphériques au cours d'un processus de transformation décrit sous le nom de « **starvation-survival** » (Kjelleberg, 1993, Morita, 1997). Elles synthétisent des

systèmes de transport alternatif leur permettant une meilleure exploitation des ressources et produisent des protéines de stress qui leur permettent de résister aux agressions de l'environnement tels que l'élévation de température, le choc oxydatif, le choc osmotique, etc. (3) Dans certaines conditions de stress métabolique, comme la carence en nutriments (starvation), la cellule bactérienne peut accéder à un état nouveau dit «**viable mais non cultivable**» (viable but non culturable state; VBNC). Comme cela a été décrit par Oliver (1993) ces bactéries ne peuvent être détectées sur les milieux de culture conventionnels; elles sont pourtant métaboliquement actives (INT+) et potentiellement pathogènes. (4) L'aspect le plus remarquable de la survie et de la persistance de *Legionella* dans le milieu aquatique est leur **croissance intracellulaire dans les protozoaires**. Les *Legionella* sont en effet incapables d'une multiplication extracellulaire dans la masse d'eau (Abu Kwaik et al, 1998), excepté peut-être dans certaines conditions écologiques très particulières, en association avec des cyanobactéries ou des algues vertes (Tison et al, 1980, Wadowski and Yee, 1985). Les protozoaires représenteraient le réservoir naturel des *Legionella* dans l'environnement, comme de multiples exemples le laissent entendre (Atlas, 1999). Au cours de l'infection amibienne, les *Legionella* acquièrent le pouvoir de résider et de se multiplier dans un phagosome entouré du reticulum endoplasmique rugueux qui constituerait une véritable réserve de nourriture en même temps qu'un compartiment cellulaire original. Pour Cirillo et al (1999) ce passage replicatif dans les protozoaires rendrait les bactéries compétentes pour pénétrer dans les cellules de mammifères et produire la maladie humaine. Le cycle de multiplication intracellulaire des *Legionella* dans les amibes ou dans les macrophages comporte, en effet, de remarquables similitudes, comme l'ont parfaitement décrit Swanson et Hammer (2000). Après avoir été ingérées puis emprisonnées dans un phagosome entouré de reticulum endoplasmique (autophagosome), les *Legionella* se convertissent en formes réplcatives, tolérantes aux acides et n'exprimant pas de facteurs de virulence, y compris ceux qui bloquent la fusion lysosomiale. Dans le compartiment lysosomal, les *Legionella* se multiplient abondamment grâce à l'apport nutritif induit, puis, lorsque le pool d'acides aminés vient à manquer, l'accumulation de guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) coordonne l'entrée des *Legionella* en phase stationnaire, capables d'exprimer leurs caractères de virulence et de promouvoir ainsi la transmission à un nouveau phagocyte.

Ces caractéristiques de développement permettent de mieux comprendre comment les *Legionella* peuvent se maintenir et proliférer dans les réseaux d'eau d'alimentation et dans les appareils divers où l'eau sera réchauffée puis rejetée en aérosols dans l'air ambiant. La température de croissance optimale des *Legionella* (*pneumophila*) serait de 32-35°C (Wadowsky, 1985). D'après l'OMS (WHO, 2002a) la colonisation des réseaux de distribution par les *Legionella* est fréquente entre 20°C et 50°C ce qui est le cas, bien évidemment, des eaux chaudes sanitaires. Les principaux sites de colonisation concernent les conduites (en particulier les points bas) et tous les appareils accessoires branchés sur le réseau tels que chaudière, vase d'expansion, réservoirs, etc. au niveau desquels des sédiments peuvent se déposer. Pour éviter la colonisation, l'eau devrait être stockée et distribuée à une température d'au moins 50°C, voir davantage (WHO, 2002a) et mesu-

rée au robinet après moins d'une minute d'écoulement. Les réseaux d'eau froide devraient être exempts, voir faiblement contaminés en *Legionella* lorsque la température de l'eau ne dépasse pas 20°C, lorsqu'une chloration efficace (0,2 mg/l en chlore libre) est programmée sur la totalité du réseau et à condition que l'eau ne soit pas soumise à de longues périodes de stagnation. Malheureusement toutes ces conditions sont difficiles à remplir techniquement: les canalisations d'eau froide peuvent être au voisinage des canalisations d'eau chaude, le taux de chlore peut être consommé sur la longueur du réseau et la stagnation source de dépôts peut survenir particulièrement au niveau des dispositifs connectés au réseau. La prévention des légionelloses est avant tout d'ordre technologique. Elle dépend essentiellement des moyens techniques que l'on pourra mettre en œuvre pour éviter la multiplication des *Legionella* dans les réseaux et les divers dispositifs susceptibles de favoriser leur croissance. Ces moyens sont, comme nous venons de le rappeler, le maintien d'une température adaptée ainsi que la permanence d'une chloration efficace. La difficulté est la mise en œuvre de ces moyens.

La legionellose représente actuellement l'un des risques infectieux majeurs liés à l'eau d'alimentation et à ses usages. L'évaluation des risques se heurte à de nombreuses incertitudes. Le risque est majeur dans la mesure où les *Legionella* vivent, survivent et prolifèrent dans les réseaux à la faveur de la protection des protozoaires et des biofilms, dans la mesure où il n'existe pas de marqueurs biologiques de leur présence, dans la mesure enfin où les moyens techniques de prévention exigent une maintenance particulièrement difficile et coûteuse.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa est un microorganisme ubiquiste de l'environnement, des eaux douces, du sol et des végétaux. Ses exigences nutritionnelles minérales et sa capacité à survivre dans des conditions hostiles font qu'il s'adapte facilement à une large variété de situation, voir sur des substrats particuliers tels que le fuel, les antiseptiques, les savons, etc. Cette bactérie a été isolée de nombreux aliments d'origine végétale consommés crus tels que tomates, radis, concombres, oignons, laitues, cresson, etc. (Hardalo and Edberg, 1997) à des taux pouvant atteindre 10³/g. Sa présence est constante et abondante dans les eaux usées et par conséquent dans les eaux de surface qui reçoivent ces effluents pollués. La croissance de cette bactérie dans les eaux douces n'est pas directement liée à la teneur en matière organique; elle peut en effet se développer dans les eaux les plus pures telles que les eaux minérales naturelles. Bien qu'aussi largement répandue dans notre environnement naturel elle peut se révéler comme un pathogène significatif, responsable de maladies sur une grande variété de plantes, d'insectes et d'animaux à sang chaud. Chez l'homme c'est un pathogène opportuniste, bien connu en milieu hospitalier, à l'origine 10 à 20 % des infections nosocomiales, sélectionné par les traitements antibiotiques auxquels il est le plus souvent résistant (Leclerc et al, 2002).

Dans leur revue générale Hardalo et Edberg (1997) ont analysé les aspects particuliers du pouvoir pathogène de *P. aeruginosa*. Ce pouvoir pathogène est réservé en effet à un certain nombre de groupes de patients sévèrement immunodéprimés. Ce sont (1) les brûlés chez lesquels les mécanismes de défense non spécifiques sont détruits, ce qui conduit à un état d'immunodépression locale et systémique au niveau humoral et cellulaire; (2) les malades cancéreux, leucémiques soumis à une chimiothérapie intensive qui deviennent neutropéniques et particulièrement sensibles aux agents pathogènes tels que *P. aeruginosa*; (3) les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux des unités de soins intensifs, soumis à des interventions multiples (tubage endotrachéal, cathéter veineux, sondage urinaire, etc.) qui facilitent la pénétration des germes cutanés et la colonisation des muqueuses; (4) à ces catégories de malades, il faut ajouter les patients atteints de mucoviscidose chez lesquels surviennent des infections pulmonaires à *P. aeruginosa* (souches mucoïdes) liées à la détérioration progressive de la fonction pulmonaire. Chez les sidéens par contre, le rôle de *P. aeruginosa* dans les infections apparaît relativement mineur. *P. aeruginosa* a la capacité de produire une large variété de facteurs de virulence qui s'exprimeront dès lors que des conditions favorables apparaîtront, c'est-à-dire sur des organismes immunodéprimés: facteurs d'adhésion (production de pili, souches mucoïdes, alginate), facteurs d'invasion et de destruction cellulaire (exotoxine A, élastase, protéase alcaline, hémolytine, leucocidine), activité anti-inflammatoire (destruction des immunoglobines et des composants du complément). Du fait de sa large distribution dans l'environnement (eau, air, aliments, plantes) *P. aeruginosa* pourra entrer facilement en contact avec l'hôte humain, pénétrer par voie transcutanée (cathéter, sonde...), établir sa niche au niveau des surfaces cutanées et des muqueuses (brûlés, mucoviscidose), envahir et détruire les tissus sous-jacents.

Chez le sujet immunocompétent aucune de ces conditions n'est offerte à la bactérie pour pénétrer, se fixer, s'établir puis diffuser et envahir les tissus et les organes. Chaque jour en effet, l'homme peut entrer en contact avec des milliers, voir des millions de cellules de *P. aeruginosa* en particulier à travers les aliments consommés crus, dans une plus faible mesure avec les bains, les douches. *P. aeruginosa* peut se multiplier dans une large variété d'environnements humides, de surfaces, sur les produits alimentaires. En dépit de ces contacts multiples de la vie quotidienne ce germe ne s'implante pas et ne colonise pas l'hôte humain normal de façon significative et durablement. Un faible pourcentage d'individus (quelques %) hébergent la bactérie dans leur intestin et à des taux très bas, de l'ordre de 10^2 - 10^3 /g (Leclerc et Moriametz, 1980) probablement du fait d'un désavantage compétitif par rapport à la flore autochtone pré-établie. En fait *P. aeruginosa* est avant tout une bactérie aquicole dont la niche écologique est caractérisée par la faible concentration ionique (eau douce), la faible teneur en matières organiques (sucres et protéines) et un large éventail de température. Ces conditions sont très différentes de celles que l'on rencontre dans les tissus humains.

L'un des points ayant fait l'objet de débats concerne le pouvoir entéro-pathogène de cette bactérie. Certaines souches, en effet, sont capables de produire une entérotoxine et un certain nombre de publications anciennes (depuis 1894) rap-

portées dans notre revue (Leclerc et al, 2002) mettent en cause cette bactérie dans des cas épidémiques de diarrhée infantile. Une maladie entérique fébrile suivie de septicémie a été décrite par Dold en 1918 sous le nom de «fièvre de Shanghai», affectant enfants et adultes. Il est difficile d'interpréter ces anciennes observations et surtout de leur accorder un certain crédit tant il est vrai qu'à cette époque les méthodes d'investigation étaient principalement d'ordre bactériologique et que celles concernant les autres agents étiologiques responsables de diarrhée tels que les virus et les protozoaires étaient inexistantes ou inadaptées. L'analyse de ces rapports (Hardalo et Edberg, 1997) montre que, dans chaque cas, de mauvaises conditions d'hygiène avaient favorisé la prolifération de la bactérie dans les préparations alimentaires destinées aux enfants, conduisant à une colonisation de leur intestin, les signes de diarrhée disparaissant dès que des conditions hygiéniques favorables étaient rétablies. D'autre part, comme le signale Lepow (1994), aucune épidémie de diarrhée due à *P. aeruginosa* n'a été signalée au cours des dernières décades, ce qui est le résultat probable de l'amélioration de nos méthodes diagnostiques (virus et protozoaires) et des mesures de contrôle hygiénique. Une expérimentation, conduite chez des volontaires humains, montre que l'ingestion d'une dose de 10^6 *P. aeruginosa* (Buck and Cooke, 1969) est marquée simplement par une brève période d'isolement du germe dans les selles sans colonisation durable et sans aucun signe de diarrhée chez les receveurs. Au cours d'une expérimentation chez des souris gavées avec des doses de 10^9 *P. aeruginosa*, aucun des animaux ne tombait malade, et la plupart d'entre eux (75 %) n'avaient pas de signe de colonisation intestinale.

Les infections opportunistes à *P. aeruginosa* sont avant tout des infections nosocomiales qui surviennent soit chez des groupes de patients souffrant d'immunodépression profonde, soit chez des malades hospitalisés soumis à des explorations invasives ou porteurs de plaies, d'escarres, de blessures facilitant l'infection, la colonisation puis la maladie. L'eau contaminée peut être un facteur additionnel de risque pour ces malades et il est indispensable qu'elle soit surveillée et contrôlée. Le cas de la population générale est fondamentalement différent. Le risque d'infection dû à la présence de *P. aeruginosa* dans les eaux d'alimentation apparaît insignifiant. Nous pouvons en ingérer chaque jour des quantités substantielles dans les aliments et nous sommes fréquemment au contact de cette bactérie à travers nos activités multiples. L'histoire clinique d'une infection à *P. aeruginosa* (principalement digestive) en relation avec une eau d'alimentation n'a jamais été décrite.

Aucune étude épidémiologique n'a montré, dans l'état actuel de nos connaissances, l'existence d'une association entre la présence de cette bactérie dans les eaux d'alimentation et l'apparition de cas de maladie. Il est raisonnable de considérer avec Hunter (2002), Fricker (2002) et Allen et al (2002) que la présence de *P. aeruginosa* dans les eaux d'alimentation ne pose pas un problème de santé publique d'actualité.

LES AEROMONAS

On distingue traditionnellement deux groupes d'*Aeromonas*. Le premier comprend l'espèce psychrophile *A. salmonicida* responsable de maladie chez les poissons, en particulier les salmonidés. Le second groupe rassemble des bactéries mésophiles à l'origine d'infections humaines, représentées initialement par l'espèce *A. hydrophila*. Les progrès de la taxonomie moderne (hybridation ADN/ADN) ont fait éclater cet ensemble chez lequel on reconnaît actuellement 16 groupes d'hybridation représentant 16 espèces (Nichols et al, 2002a); plusieurs d'entre elles sont associées à des maladies humaines. Ce sont *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandei*, *A. shubertii*, *A. veronii* subsp. *veronii*, *A. veronii* subsp. *sobria*.

Les *Aeromonas* sont des hôtes naturels de l'environnement aquatique, principalement des eaux douces, atteignant des taux de 10^6 - 10^8 CFU/ml dans les eaux usées domestiques et de 10 - 10^3 CFU/ml dans les eaux de rivière (Schubert, 1991). Plusieurs études tendent à montrer que leur croissance serait liée à la charge organique du milieu. Ils sont pourtant isolés aussi facilement des environnements riches ou pauvres en matière organique. Une documentation exhaustive sur ce sujet pourrait être consultée avec intérêt dans la récente revue de l'OMS (WHO, 2002a). Leur abondance dans les eaux usées n'est pas directement liée à la contamination fécale. Les *Aeromonas*, en effet, ne sont pas des bactéries intestinales de l'homme ou de l'animal. Ils ne peuvent être considérés comme des indicateurs de contamination fécale comme le sont, par exemple, les *E. coli*. Ils sont facilement isolés des réseaux d'eau de distribution avec des fréquences et des taux qui varient selon les auteurs et les situations décrites. Les facteurs qui conditionnent leur présence et leur croissance ont été largement décrits (WHO, 2002a). Dès les années 1962 (Leclerc and Buttiaux, 1962) nous avons signalé leur fréquence dans les échantillons d'eau potable où leur présence était systématiquement confondue avec celle des coliformes. Cette observation a été, par la suite, largement confirmée (Havelaar et al, 1990, Schubert, 1991, Krovacek et al, 1992). Les *Aeromonas* colonisent en effet les canalisations d'eau, comme le font également de nombreuses espèces de coliformes, mais ils ne sont pas en mesure de prédominer dans les biofilms formés essentiellement de bactéries indigènes et « oligotrophes », gram négatives le plus souvent, appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, mais également à des bactéries Gram + des genres *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, etc. Toutes ces bactéries sont probablement plus compétitives dans leur capacité à utiliser les multiples composés organiques de l'eau. Cette colonisation des réseaux par les *Aeromonas* s'effectue en dépit de leur relative sensibilité aux composés chlorés et du fait de leur fixation dans les biofilms où ils peuvent former de véritables consortium de membres coopératifs en même temps qu'ils se trouvent protégés des prédateurs, à l'image de ce qui se passe avec les coliformes (autres qu'*E. coli*).

La fréquence des *Aeromonas* dans les eaux d'alimentation à des taux loin d'être négligeables fait poser la question de leur signification sanitaire (Leclerc et

al, 2002). Les infections associées aux *Aeromonas* sont de deux types. Ils sont tout d'abord responsables occasionnellement d'infections de plaies à la suite de contact avec l'eau (baignade, pêche, canotage, etc.). Ils sont d'autre part impliqués dans des cas de gastroentérites pouvant être dû aux aliments et à l'eau de consommation. D'assez nombreuses données cliniques et épidémiologiques tendent à affirmer le pouvoir entéropathogène des *Aeromonas* (Janda, 1991, Janda et Abbott, 1998, Albert et al, 2000). Certains auteurs considèrent que les souches (pathotypes) de certaines espèces pourraient être entéropathogènes, une situation analogue à celle qui est décrite chez les *E. coli* et *Yersinia enterocolitica* (Farmer et al, 1992). De nombreux produits extracellulaires représentant des facteurs de virulence peuvent être élaborés par les *Aeromonas* ou ont été décrits (Stelma et al, 1986, Janda, 1991): une beta-hémolysine d'activité cytotoxique, dermonécrotique et léthale pour la souris, une entérotoxine cytotonique, des protéases. Les *Aeromonas*, en particulier l'espèce *A. hydrophila*, peuvent donc produire des composés extracellulaires bien connus dans l'expression du pouvoir entéropathogène des bactéries. L'isolement d'*Aeromonas* dans les selles de malades diarrhéiques (en particulier chez les enfants de moins de 5 ans) a été mentionné au cours de plusieurs études (Krovacek et al, 1989, Ashiru et al, 1993). A cette série d'arguments en faveur du pouvoir entéropathogène des *Aeromonas* de l'eau et de leur rôle dans les gastroentérites, on oppose que les *Aeromonas* peuvent être isolés aussi souvent chez les sujets contrôles que chez les diarrhéiques, suggérant que les *Aeromonas* pourraient être simplement des hôtes transitoires (fellow traveler) de l'intestin humain (Altweg et Geiss, 1989). Au cours d'expérimentations chez des volontaires, l'ingestion de doses massives (10^{10} bactéries) n'a provoqué aucun cas de diarrhée et la plupart des sujets infectés n'ont pas excrété le microorganisme (Morgan et al, 1985). La valeur de ces données a pourtant été mise en cause (Gosling, 1996) compte tenu de la caractérisation sommaire des souches.

La source d'exposition aux *Aeromonas* n'est pas uniquement l'eau de consommation. De nombreux aliments consommés crus ou autres peuvent aussi en être porteurs, à des taux importants à la suite de leur multiplication (Kirov, 1993), ce qui laisserait entendre que les produits alimentaires pourraient être les candidats les plus probables vis-à-vis du risque entérique. Dans le domaine de l'eau de consommation, l'étude la plus anciennement citée est celle de Burke et al (1984) en Australie qui observent au cours d'une année d'étude dans la ville de Perth une étroite corrélation entre la présence d'*Aeromonas* dans les selles des malades (hospitalisés) et le taux d'*Aeromonas* isolés dans les eaux de distribution. D'autres études plus récentes (Havelaar et al, 1992, Hänninen, 1994) tentent d'établir une corrélation entre les souches isolées des malades et celles des eaux d'alimentation à l'aide de marqueurs épidémiologiques, sans succès. Les études épidémiologiques de Holmberg et al (1986) et Kuijper et al (1989) sont également incapables d'établir une relation causable directe entre les souches des deux origines. En fait, dans toutes les études citées, il est parfaitement plausible que les individus malades aient été colonisés par des *Aeromonas* provenant de leur eau d'alimentation et que leur maladie ait une toute autre origine. Selon Hunter (2002) le principal problème concernant le risque sanitaire lié à la présence des *Aeromo-*

nas dans les eaux d'alimentation a trait à l'incertitude, qui subsiste, sur le pouvoir entéropathogène de ces bactéries.

Dans une récente revue, Edberg et Allen (2002b) considèrent que les *Aeromonas* ne remplissent pas la plupart (sinon la totalité) des critères qui sont exigés pour qu'un germe soit un entéropathogène de l'eau d'alimentation. Plusieurs points synthétisent leurs données (Allen et al, 2002): (1) un faible pourcentage de souches d'*A. hydrophila* peuvent être responsables de gastroentérites ou d'entérites banales, de faible durée et autolimitantes. La plupart des cas sont d'origine alimentaire et quelques cas seulement seraient associés à l'ingestion d'eau de puits (non traitées). (2) La concentration des *Aeromonas* est beaucoup plus élevée dans les aliments que dans les eaux d'alimentation. Un faible pourcentage de souches possède des facteurs de virulence. (3) Dans les quelques enquêtes épidémiologiques citées, il y a peu de similitude entre les souches isolées de l'eau et les cas de diarrhée. (4) Les souches d'*Aeromonas*, y compris celles d'*A. hydrophila* sont de faible virulence. Compte tenu de ces données, les auteurs estiment qu'il n'y a pas d'arguments suffisants pour considérer les *Aeromonas* des eaux d'alimentation comme des pathogènes opportunistes et qu'il serait inapproprié d'envisager pour cette catégorie de microorganismes une réglementation et une surveillance analytique.

LES BACTÉRIES DU COMPLEXE MYCOBACTERIUM AVIUM (MAC)

Parmi les mycobactéries on distingue classiquement les mycobactéries de la tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum*) et les mycobactéries autres que celles de la tuberculose que l'on appelait initialement les mycobactéries atypiques. Dans une revue de référence, Wolinsky en 1979 montrait que certaines mycobactéries non tuberculeuses peuvent être pathogènes; les plus communes étaient les espèces *M. avium* et *M. intracellulare* composant le complexe *M. avium* (Leclerc, 1995). Sur la base de parentés génétiques et phénétiques il a été proposé que *M. avium*, *M. paratuberculosis* et le « bacille du pigeon » forment une seule et même espèce sous les noms de *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* et *M. avium* subsp. *silvaticum*.

Contrairement aux mycobactéries de la tuberculose qui vivent et se multiplient dans les tissus de l'hôte qu'ils infectent, les mycobactéries non tuberculeuses sont largement distribuées, sous forme libre, dans l'environnement hydrotellurique. Elles ont été isolées fréquemment d'eaux d'alimentation distribuées après traitement. On les considère non pas comme des contaminants dispersés à partir d'une source originelle mais comme de véritables bactéries indigènes, hydrotelluriques, capables de survivre et de se multiplier dans l'environnement. Les caractéristiques physiologiques de ces mycobactéries longuement décrites par Falkinham (1996) expliquent leur distribution écologique. Capables de se développer dans un large éventail de pH (jusque pH 5), de température (jusque 45°C),

en milieu salé, décomposant une grande variété de composés xénobiotiques, transformant les acides humiques et fulviques, elles sont, de plus, fortement résistantes à la désinfection chlorée, pouvant aussi échapper à l'action des désinfectants lorsqu'elles sont phagocytées par les protozoaires comme les amibes. Toutes ces propriétés favorisent leur survie, voir leur croissance dans l'environnement aquatique naturel, dans les eaux d'alimentation traitées, dans les piscines et les aquariums, pouvant rendre ces milieux contaminants pour l'homme. Leur présence dans les réseaux d'eau distribuée a été fréquemment décrite (LeChevallier, 2002, Leclerc et al, 2002). Au cours d'une récente étude LeChevallier et al (2001) Falkinham et al (2001) ont analysé huit réseaux de distribution choisis en fonction de l'origine de l'eau, des caractéristiques du traitement, du taux de matière organique (AOC et BDOC), sur une période de 18 mois. Des 528 échantillons collectés sur l'eau brute, sur l'effluent traité et dans l'eau distribuée, 15 % contiennent des mycobactéries (à croissance lente) parmi lesquelles 3 % de *M. avium* et 1 % de *M. intracellulare*. L'espèce *M. avium* est isolée dans 1 % environ des échantillons d'eau distribuée et *M. intracellulare* dans 2 %. Cette fréquence est plus élevée dans les échantillons de biofilms (respectivement 5 % et 24 %) ce qui tendrait à montrer que le taux de ces mycobactéries serait réduit au cours du traitement puis amplifié par croissance dans les biofilms. L'augmentation du nombre de mycobactéries (plus élevé dans les échantillons d'eau distribuée) est corrélé avec le taux de matières organique assimilable et biodégradable (AOC et BDOC).

Avant l'apparition du sida les mycobactéries atypiques du complexe *M. avium* (MAC) étaient responsables d'affections pulmonaires proches de la tuberculose, d'adénites (adénites cervicales de l'enfant), de lésions cutanées et beaucoup plus rarement d'infections généralisées ou disséminées. L'épidémie mondiale de sida a complètement transformé le contexte nosologique de ces mycobactérioses et leur fréquence fait de ces infections, rares autrefois, une préoccupation pathologique majeure. L'infection due aux bactéries du complexe *M. avium* est en effet communément associée au sida en Europe et aux Etats-Unis. Elle est l'un des critères cliniques caractéristiques de la maladie au stade 4, comme le propose l'OMS. Elle survient tardivement au cours de l'évolution du sida, aggrave le pronostic et ne répond pas à la chimiothérapie antituberculeuse standard. Contrairement à l'infection tuberculeuse pulmonaire qui peut survenir au cours du sida, les infections à *M. avium* sont habituellement disséminées, avec des amas de bacilles intracellulaires localisés dans de nombreux organes (Leclerc, 1995) sans réaction tissulaire observable.

La source des infections du complexe MAC au cours du sida est pour l'instant inconnue. La transmission d'individu à individu chez les patients est peu vraisemblable. Etant donné, d'une part, les atteintes digestives fréquentes dues aux mycobactéries chez les sidéens (indépendantes des facteurs sociaux, Leclerc, 1995), leur dissémination sanguine, compte tenu, d'autre part, de leur relative distribution dans l'environnement et de la colonisation possible des réseaux de distribution d'eau potable, il importe, à l'évidence, d'évaluer le risque que cette contamination peut entraîner pour les consommateurs et plus particulièrement pour les groupes d'individus particulièrement sensibles comme les sidéens. A ce jour,

pourtant, les observations mettant en cause l'eau de consommation dans des cas d'infections à *M. avium* sont exceptionnelles. La plus intéressante est celle de von Reyn et al (1994) qui concerne des patients sidéens chez lesquels il a isolé de multiples souches de *M. avium*. Les données épidémiologiques (analyse des souches par électrophorèse en champ pulsé) montrent que pour certains des malades le réseau d'eau chaude sanitaire de l'hôpital est la source de l'infection. Etant donné que les réseaux d'eau chaude et d'eau froide sont communs on peut en déduire que l'eau d'alimentation est très vraisemblablement à l'origine de la contamination. D'autres travaux (Ristola et al, 1999) ne confirment pas ces observations. L'importante étude cas-contrôle de Horsburgh et al (1994) destinée à rechercher les facteurs de risques environnementaux dans les infections MAC des sidéens exclut toute association à l'exposition à l'eau ainsi qu'à d'autres sources environnementales.

L'ensemble de ces données laisse entendre finalement que les mycobactéries du complexe *avium* sont assez largement distribuées dans notre environnement hydro-tellurique, qu'elles peuvent éventuellement contaminer les réseaux d'eau d'alimentation (faible fréquence et faible taux), que leur croissance peut être largement favorisée par la température et qu'en conséquence elles peuvent coloniser les réseaux d'eau chaude sanitaire. Du point de vue santé publique cette situation ne paraît pas comporter de risque particulier pour la population générale ou du moins aucune observation n'a été faite pour accréditer cette hypothèse. Le problème pourrait concerner certains groupes de patients à risque, en particulier les sidéens, mais il reste pour l'instant sujet à controverse, surtout pour ce qui concerne les actions préventives à mettre en œuvre, comme le font remarquer Singh et Yu (1994) et Montecalvo et al (1994) en commentaires du travail de Von Reyn et al (1994).

Parmi les autres mycobactéries non tuberculeuses qui ont donné lieu à certains débats, il faut citer *M. kansasii* et *M. paratuberculosis*. Un grand nombre de rapports ont mentionné la présence de *M. kansasii* dans les eaux de distribution et dans les eaux chaudes sanitaires (Falkinham III, 1996). Comme pour *M. avium* le rôle de l'eau dans les cas d'infections (pulmonaires ou disséminées) peut être suspecté. De même certains auteurs (Herman Taylor et al, 2000) ont émis l'hypothèse que la maladie de Crohn pourrait être transmise par des aérosols d'eau contaminée par les animaux d'élevage. L'hypothèse de l'origine bactérienne de la maladie de Crohn est pourtant largement controversée depuis de nombreuses années et nos connaissances sur la présence, la survie ou la colonisation des milieux aquatiques naturels par *M. paratuberculosis* restent précaires.

LES BACTERIES DITES «HPC» ET LEUR IMPLICATION EN SANTE PUBLIQUE

Le terme de bactéries «hétérotrophes» fait référence aux bactéries qui ont besoin de composants organiques pour leur croissance, contrairement aux bacté-

ries dites «autotrophes» qui peuvent utiliser le CO₂ comme source de carbone. Notre environnement tellurique, aquatique, aérien, végétal est peuplé de bactéries hétérotrophes qui jouent un rôle essentiel dans le cycle de la matière organique. Il peut être contaminé par des bactéries pathogènes provenant de l'homme et des animaux, également hétérotrophes (bactéries entériques telles que *Salmonella*, *Shigella*, bactéries à tropisme pulmonaire telles que les *Legionella*) ainsi que par des germes indicateurs tels que les coliformes. Le test HPC est un test mondiallement reconnu et utilisé pour mesurer la population bactérienne hétérotrophe dans les eaux d'alimentation (distribuées en réseaux ou embouteillées). De nombreuses méthodes ont été décrites au cours du temps pour mesurer les bactéries HPC. Elles sont caractérisées par la composition et les modes d'ensemencement du milieu, le temps et la température d'incubation. L'historique de ces méthodes et leur diversité ont été décrites par Reasoner (1990). Les données obtenues sont différentes selon les méthodes et l'objectif recherché est de sélectionner les meilleures variables pour obtenir les plus hautes concentrations de microorganismes, si possible dans le minimum de temps. Il est important de souligner que (1) le test HPC ne peut mesurer qu'une fraction des bactéries hétérotrophes présentes dans le milieu, c'est-à-dire celles qui sont cultivables dans les conditions choisies; ce pourcentage peut être inférieur à 1 % voir 1‰ du nombre total de bactéries comptées en acridine orange; (2) le test n'est pas capable de faire la différence entre bactéries pathogènes et non pathogènes; (3) certaines bactéries pathogènes comme les *Legionella* et les mycobactéries du complexe *avium* ne peuvent pas se développer dans les conditions du test.

Le test HPC est habituellement utilisé pour contrôler l'efficacité des traitements de l'eau d'alimentation, en particulier de la désinfection, et pour surveiller la qualité de l'eau traitée au cours de la distribution et du stockage. Cependant, certains microbiologistes se sont inquiétés de la présence dans les populations HPC de bactéries pathogènes opportunistes telles que *Pseudomonas aeruginosa*, des *Aeromonas*, des *Klebsiella* ou d'autres bactéries non reconnues comme entéropathogènes et en conséquence de l'intérêt de considérer le test HPC comme un paramètre de santé publique. Cette question a finalement fait l'objet d'un symposium international (NSF/WHO, 2002) dans le but de parvenir à un consensus reposant sur les données scientifiques existantes et portant sur l'interprétation des mesures du test HPC dans l'eau d'alimentation.

Un certain nombre d'études épidémiologiques peu nombreuses ont été mises en œuvre dans le but de rechercher une association possible entre les bactéries HPC et d'éventuels effets de santé chez l'homme. La toute première est une étude longitudinale conduite par Zmirou et son équipe (Ferley et al, 1986; Zmirou et al, 1987) concernant des populations (52 villages – 18 mois) alimentés avec une eau de surface non traitée et analysée chaque semaine. Les eaux non conformes aux normes européennes étaient associées avec un taux plus élevé de gastro-entérites. Cette association était la plus marquée avec les taux de streptocoques fécaux et de coliformes thermotolérants. Par contre, les concentrations de coliformes et d'HPC n'étaient pas corrélées avec le risque. Les enquêtes plus récentes de Payment au Canada ont suscité un grand intérêt, donnant lieu à de nombreux commentaires.

La première étude randomisée de Payment et al (1991a, 1991b) avait pour but de comparer le taux de maladies entre deux groupes de personnes consommant, le premier l'eau du robinet, le second la même eau filtrée par osmose inverse au point d'usage. Dans le second groupe (protégé) on notait 35 % de gastro-entérites en moins que dans le premier (non protégé). De plus, les auteurs mettaient en évidence une association entre les gastro-entérites et les mesures HPC à 35°C (eau osmosée). Il s'agissait en fait, d'une apparente corrélation, reconnue par Payment lui-même (2002), et largement explicitée par Colford (2002) et Nichols et al (2002b). La seconde étude de Payment et al (1997) comprenant 4 groupes de consommateurs (eau du robinet, robinet avec purge, eau embouteillée provenant de l'usine de traitement, eau minérale ou eau embouteillée ozonée) est d'un intérêt tout particulier dans la mesure où elle était formellement destinée à tester la relation HPC/maladies. Dans les deux groupes de consommateurs d'eau embouteillée (HPC beaucoup plus élevé dans l'eau de l'usine que dans l'eau ozonée) les taux d'infections gastro-intestinales ne sont pas significativement différentes. Par contre, on observe moins de cas d'infections chez les consommateurs d'eau du robinet (HPC élevé) que pour les consommateurs d'eau de robinet purgée (HPC faible). Cette étude montre finalement l'absence de corrélation entre les taux de bactéries HPC et les infections gastro-intestinales humaines. L'enquête australienne randomisée de Hellard et al (2001) ne s'est pas intéressé directement aux bactéries HPC. Il est pourtant intéressant d'observer qu'aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les coliformes totaux et les infections intestinales. Il faut citer enfin deux études de Calderon (1988), Calderon et Mood (1991) qui ont été réalisées à la demande de l'USEPA pour examiner les concentrations d'HPC au point d'utilisation du consommateur (appareils de filtration ou non) et leur association avec des gastro-entérites. Le taux moyen de bactéries HPC était de 10^6 par jour dans le cas des eaux filtrées. Les deux études n'ont pas montré l'existence d'un risque particulier dû aux bactéries HPC. Il découle finalement de toutes ces études qu'aucune relation n'a pu être montrée entre les taux de bactéries HPC des eaux d'alimentation et les infections gastro-intestinales.

Pour qu'une bactérie soit responsable d'une infection digestive, elle doit posséder un certain nombre de composants spécifiques ou facteurs de virulence qui lui permettent de survivre à l'acidité de l'estomac, d'adhérer aux cellules, de tuer les cellules (cytotoxicité), d'envahir les tissus et les organes (enzymes extracellulaires). La recherche de ces facteurs de virulence peut donc être un moyen indirect pour montrer l'existence d'un risque de santé lié aux bactéries HPC. D'après les études initiales de Lye et Dufour (1991) les bactéries HPC en sont habituellement dépourvues. En utilisant le procédé de filtration sur membrane décrit par Lye et Dufour (1991), Payment et al (1994) montrent l'importance du choix du milieu. Sur gélose au sang, 13 % des colonies (provenant d'échantillons d'eau du robinet) sont hémolytiques, contre moins de 3 % sur le milieu R2A; mais aucune de ces bactéries n'est entéropathogène. Dans les échantillons d'eau analysés par Edberg et al (1996, 1997; Edberg and Allen, 2002) (eau du robinet, eau embouteillée, fontaines réfrigérantes) les bactéries isolées ne possèdent pas de caractères de virulence significatifs; de plus elles sont incapables de survivre en milieu acide.

A ces données pathogéniques et épidémiologiques s'ajoutent certaines données expérimentales qui montrent que le tube digestif humain possède son propre système immunologique de défense, d'une grande efficacité (voir section: qu'est-ce qu'une bactérie pathogène opportuniste). Les essais d'ingestion chez l'homme de bactéries HPC comme *P. aeruginosa* (voir section *P. aeruginosa*) ou *Aeromonas* (voir section *Aeromonas*) n'ont jamais réussi à déclencher une infection gastro-intestinale. Chez les souris, même soumises à une profonde immunodépression (Smith et al, 2001), des doses importantes de bactéries HPC (10^4 - 10^5) inoculées par voie intrapéritonéale ne sont pas en mesure d'engendrer une infection.

Les conclusions du symposium international NSF/WHO sur les bactéries HPC sont très claires: il n'existe actuellement aucune donnée indiquant que les bactéries HPC puissent être directement associées à un risque de santé pour le consommateur humain. Le test HPC ne peut en conséquence être utilisé comme critère de santé publique; à lui seul il ne peut justifier la prise de décision de faire bouillir une eau. Le test HPC ne peut pas davantage être un indicateur de la présence de bactéries pathogènes opportunistes telles que *P. aeruginosa*, *Aeromonas*, les bactéries du groupe *M. avium* comme cela résulte des études de Schubert et al (2002) et Galassi et al (2002).

LE STATUT PARTICULIER DES EAUX MINÉRALES NATURELLES

Il apparaît essentiel de distinguer deux catégories d'eau d'alimentation du point de vue de leur origine: d'une part celles qui proviennent d'eaux de surface ou d'eaux souterraines sous l'influence directe des eaux de surface dites «vulnérables» qui toutes deux nécessitent un traitement, y compris de désinfection et d'autre part celles extraites d'aquifères souterrains comme les eaux minérales, ces aquifères étant protégés de tout risque de pollution et qualifiés de «non vulnérables». Au cours de plusieurs revues générales (Leclerc and da Costa, 1998; Leclerc, 2002; Leclerc et Moreau, 2002) nous avons décrit les caractéristiques des eaux minérales du point de vue écologique et épidémiologique. Nous rappellerons brièvement ici les aspects relatifs aux bactéries HPC d'une part et à certaines bactéries dites «pathogènes opportunistes» d'autre part.

Les bactéries HPC des eaux minérales naturelles sont distinctes de celles des eaux de distribution traitées, qualitativement et quantitativement. Les communautés bactériennes, identifiées par culture ou à l'aide de sondes spécifiques, sont en prédominance des bacilles aérobies à Gram -. Elles appartiennent aux trois groupes α , β et γ des protéobactéries ainsi qu'au phylum *Flavobacterium* – *Cytophaga*. Chaque source paraît caractérisée par une large diversité bactérienne phénotypique et génétique, pouvant être explorée, dans ce dernier cas, par ribotypage (Guillot and Leclerc, 1993; Vachée et al, 1997). Au cours de l'embouteillage, le nombre de bactéries viables et cultivables, très faible initialement, augmente rapi-

dement pour atteindre 10^4 - 10^5 CFU/1 ml en 3 à 7 jours. Le mécanisme de cet effet bouteille a fait l'objet de nombreuses interrogations et spéculations, décrites dans l'une de nos revues (Leclerc and Moreau, 2002). Quoiqu'il en soit et contrairement à ce qui se passe avec les eaux traitées où la stérilisation tend à faire disparaître ou à restreindre notablement le taux de bactéries HPC, dans le cas des eaux minérales, ce nombre tend à augmenter naturellement après embouteillage conformément aux caractéristiques physiologiques de ces bactéries.

Le problème de ces bactéries HPC et de leur implication en santé publique s'est posé dès l'origine, à la suite de la commercialisation « explosive » des eaux minérales naturelles dans les années 1960-70. Bien que ces bactéries des aquifères souterrains apparaissent tout à fait inoffensives (saprophytes) n'ayant jamais donné lieu à des infections communautaires ou hospitalières, un certain nombre d'études ont été réalisées à leur sujet. (1) Les premières, les plus anciennes, ont été des expérimentations animales sur des souris axéniques (Ducluzeau et al, 1976) qui ont montré que les bactéries isolées des eaux minérales naturelles étaient incapables de s'implanter dans l'intestin animal et donc à plus forte raison de s'y multiplier et de créer des troubles. (2) Une étude randomisée chez des nourrissons a été effectuée dans nos laboratoires (Leclerc, 1990). L'un des 2 groupes de nourrissons était alimenté par du lait reconstitué avec de l'eau minérale naturelle, y compris ses composants bactériens, le second groupe recevant le même lait mais reconstitué avec l'eau minérale naturelle stérile. Aucune différence n'a été observée dans les deux groupes concernant la survenue de troubles digestifs. D'autre part il n'a jamais été possible d'isoler les bactéries de l'eau minérale des écouvillons naso-pharyngés ou des échantillons de selles examinés chez le nourrisson, ce qui montre l'incapacité de ces bactéries à se fixer sur les muqueuses des organes de transit. (3) Le troisième type d'étude concerne les caractéristiques de virulence que pourraient porter les bactéries des eaux minérales. Ce travail a été réalisé dans nos laboratoires sur 240 souches représentatives de cinq sources françaises comprenant l'espèce *P. fluorescens* et plusieurs nouvelles espèces telles que *P. rhodesiae*, *P. veronii*, *P. gessardii*, *P. migulae*, *P. jessenii*, *P. mandelii*, *P. libanensis*, *P. cedrella* et *P. orientalis* (Leclerc and Moreau, 2002). Les résultats ont montré que, à la température de 37°C, aucune des souches étudiées n'était capable d'adhérer et de se multiplier en culture cellulaire (Hep-2) ni de produire d'effet cytotoxique. Ainsi l'ensemble des données biologiques (facteurs de virulence), expérimentales (sur l'animal) et épidémiologiques (enquête randomisée) montrent que les bactéries autochtones des eaux minérales (HPC) sont dépourvues de pouvoir pathogène, *in vivo* comme *in vitro*.

A ces enquêtes et études il convient d'ajouter que, depuis l'existence de la réglementation européenne en 1980 (EC, 1980), aucune épidémie ni aucun cas d'infection dû à l'ingestion d'eau minérale naturelle n'ont été rapportés dans la littérature ni déclarés aux autorités sanitaires des pays concernés.

Les bactéries pathogènes opportunistes qui ont été décrites précédemment concernaient les eaux distribuées en réseaux. A partir des eaux de surface contaminées elles peuvent en effet passer à travers les barrières de traitement, en faible quantité, pour se déposer puis se fixer et éventuellement se multiplier sur des sites

favorables des canalisations. Ces bactéries constitueront une partie plus ou moins importante des biofilms qui se développeront de façon privilégiée au niveau des bouts morts des conduites ou des zones de stagnation. Les conditions particulières d'agrément, d'exploitation, de distribution et de contrôle des eaux minérales naturelles font que le problème se présente de façon différente. Les seules bactéries pathogènes opportunistes qui pourraient poser problème sont les *Legionella* qui abondent dans les eaux de surface puis survivent et prolifèrent dans les conduites d'eau distribuée (chaude ou froide). La présence de *Legionella* dans les eaux minérales n'a jamais été décrite ni rapportée dans la littérature. Les exigences nutritionnelles de ces bactéries ne sont probablement pas propices à leur habitat et leur croissance dans les aquifères profonds. Le problème prend un autre aspect s'il s'agit de l'usage de l'eau minérale dans les stations hydrothermales. D'une part le réchauffement de l'eau peut favoriser la croissance des *Legionella*, d'autre part la distribution de l'eau en conduite peut faciliter le développement de biofilms dans lesquels pourront se fixer et se multiplier les *Legionella*. Les différents types de soins produisant des aérosols (nébuliseurs, bains bouillonnants, couloirs de marche, etc.) seront donc susceptibles de transmettre la légionellose dans la mesure où l'eau sera fortement contaminée et contaminante. La surveillance de l'eau depuis la source jusqu'aux usages est indispensable pour prévenir le risque infectieux. Les statistiques épidémiologiques montrent pourtant qu'en France les cas de légionelloses apparaissant dans les stations thermales sont rares et ne représentent qu'un très faible pourcentage des cas totaux (Campese et Decludt, 2002).

Comme pour les *Legionella*, la présence de mycobactéries non tuberculeuses et en particulier celles du groupe *Mycobacterium avium* (*M. avium*, *M. intracellulare*) n'a jamais été rapportée, en provenant d'eaux minérales naturelles. *Pseudomonas aeruginosa*, comme nous l'avons vu précédemment, est une bactérie ubiquiste de l'environnement hydrotellurique et des aliments d'origine végétale. Il n'existe actuellement aucune évidence du rôle de cette espèce dans des infections intestinales d'origine hydrique pour la population générale (voir section *P. aeruginosa*). Il en est de même en ce qui concerne les *Aeromonas* (voir section *Aeromonas*). Les germes de cette espèce peuvent être isolés relativement fréquemment des eaux d'alimentation distribuées en réseau et certains pays comme les Pays-Bas ont instauré une réglementation pour diminuer le risque d'infections (hypothétique) en particulier chez les enfants. Ces bactéries sont quelquefois isolées des eaux minérales naturelles en nombre toujours très faible. La présence de *P. aeruginosa* dans les eaux minérales naturelles est réglementée sévèrement par la législation européenne, cette présence étant interprétée comme un manque de protection de l'aquifère vis-à-vis des contaminants de surface et donc comme un signe de vulnérabilité de cet aquifère. On parle plus généralement de marqueurs ou d'indicateurs de qualité, cette bactérie, comme les coliformes ou les streptocoques fécaux, étant susceptibles de contaminer l'eau depuis la source jusqu'à l'embouteillage (indicateurs de process ou indicateurs technologiques). Ces indicateurs de qualité doivent être distingués formellement des indicateurs de contamination fécale (*E. coli*). Dès 1977 Ingram avait parfaitement compris l'importance de cette distinction pour la surveillance microbiologique des eaux et des aliments en définissant les deux catégories de marqueurs : les uns qu'il appelle « organismes

index» qui indique la présence possible de pathogènes écologiquement semblables, les autres qu'il nomme «organismes indicateurs» qui révèlent une défaillance au cours des process. Seuls les premiers (index ou indicateurs de contamination fécale) sont des indicateurs d'un risque sanitaire potentiel. La tendance actuelle est à considérer l'espèce *E. coli* comme le seul index ou indicateur de contamination fécale (Leclerc et al, 2001 ; Leclerc et Moreau, 2002). Les *Aeromonas* pourraient être considérés également comme des indicateurs de qualité mais ils sont «redundants» avec les autres indicateurs reconnus officiellement, lesquels paraissent beaucoup plus sensibles.

CONCLUSION

La présence de bactéries appelées «pathogènes opportunistes» dont certaines sont fréquemment rencontrées en milieu hospitalier, peut être observée dans les eaux d'alimentation. Ces bactéries peuvent se multiplier dans l'eau principalement au niveau des biofilms. Le risque d'infection dépend des populations concernées. Pour la population dite générale, les données actuelles montrent que les *Legionella*, qui sont naturellement présentes dans les eaux potabilisables, représentent le premier et unique danger. Le risque de légionellose qui est relativement faible, est lié à la plus ou moins forte contamination de l'eau (température) et à la formation d'aérosols contaminants (tours de refroidissement, climatiseurs, douches, etc.). En ce qui concerne les *P. aeruginosa*, les *Aeromonas* et les bactéries du complexe *M. avium*, il n'existe pas de preuve actuelle de leur association avec une maladie gastro-intestinale ou toute autre infection engendrée par l'eau d'alimentation.

Les établissements sanitaires (centres de soins, hôpitaux, centres de dialyse, cabinets dentaires) sont des milieux où le contrôle des infections doit s'exercer avec rigueur, compte tenu des populations concernées beaucoup plus sensibles et du risque infectieux provenant des microorganismes de l'environnement. Ces établissements devraient mettre au point des **plans de sécurité sanitaire de l'eau** dans le cadre d'une stratégie générale de contrôle des infections (WHO, 2002b). De tels plans devraient concerner le contrôle des contaminations de l'eau par les *Legionella* et *Pseudomonas aeruginosa*. La présence de mycobactéries du complexe *avium* est un risque qui intéresse plus particulièrement les malades du sida. Le rôle des *Aeromonas* dans les infections opportunistes et/ou nosocomiales dues à l'eau paraît aléatoire et anecdotique.

Un certain nombre d'études épidémiologiques ont été mises en œuvre pour rechercher d'éventuelles infections associées à la présence des bactéries HPC dans les eaux de consommation. L'ensemble des données amène à conclure que, en l'absence de contamination fécale, il n'existe aucun lien entre les concentrations de bactéries HPC de l'eau et des troubles de santé chez les consommateurs. Cette conclusion est confortée indirectement dans le cas des HPC contenus dans nos aliments (Mossel and Struijk, 2002).

Les eaux minérales naturelles, qui proviennent d'aquifères protégés de toute contamination et qui sont qualifiés de non vulnérables, contiennent originellement des bactéries HPC qui peuvent atteindre des taux de 10^4 - 10^5 /1 ml après embouteillage. Ces bactéries sont dénuées de pouvoir pathogène comme cela résulte d'études expérimentales chez l'animal, d'une étude randomisée chez les nourrissons, de l'absence de facteurs de virulence notée dans les populations représentatives et finalement et surtout de l'absence de cas d'infection observés ou signalés aux autorités sanitaires. La réglementation européenne, très rigoureuse pour les eaux minérales naturelles, font que les bactéries pathogènes opportunistes dont il a été question, ou bien n'ont jamais été isolées (*Legionella*, complexe *avium*), ou bien peuvent être isolées quelquefois, mais à des taux tellement faibles qu'elles ne représentent pas de risque pour le consommateur.

BIBLIOGRAPHIE

- Abu Kwaik Y., Gao L.Y., Stone B.J., Venkataraman C. and Harb O.S. (1998). Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, p. 3127-3133.
- Albert M.J. et al (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J. Clin. Microbiol.*, 38, p. 3785-3790.
- Alexander M. (1971). *Microbial ecology*. Wiley, New York.
- Allen M.J., Edberg S.C. and Reasoner D.J. (2002). Heterotrophic plate count (HPC) bacteria. What is their significance in drinking water? Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Altwegg M. and Geiss H.K. (1989). *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.*, 16, p. 253-286.
- Ashiru J.O., Salau T. and Rotilu I.O. (1993). Incidence of *Aeromonas* species in diarrhoeic stool University College Hospital Ibadan, Nigeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 16, p 51-54.
- Atlas R.M. (1999). *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ. Microbiol.*, 1(4), p. 283-293.
- Bradford Hill A. (1965). The environment and disease: association or causation? *Proc. R. Soc. Med.*, 58, p. 295-300.
- Buck A.C. and Cook E.M. (1969). The fate of ingested *Pseudomonas aeruginosa* in normal persons. *J. Med. Microbiol.*, 2, p 521-525.

- Burke V. et al. (1984). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, p. 361-366.
- Calderon R.L. and Mood E.W. (1988). Bacterial colonizing point-of-use, granular activated carbon filters and their relationship to human health. *U.S. Environmental Protection Agency*, CR-811904-01-0.
- Calderon R.L. and Mood E.W. (1991). Bacterial colonizing point-of-entry, granular activated carbon filters and their relationship to human health. *U.S. Environmental Protection Agency*, CR-813978-01-0.
- Campese C. and Decludt B. (2002). Les légionelloses déclarées en France en 2001. *BEH* n° 30-31.
- Casadevall A. and Pirofski L.A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.*, 67, p. 3703-3713.
- Casadevall A. and Pirofski L.A. (2000). Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.*, 68, p. 6511-6518.
- Cirillo J.D. et al. (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 67, p. 4427-4434.
- Colford J.M. et al. (2002). Participant blinding and gastrointestinal illness in a randomized, controlled trial of an in-home drinking water intervention. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(1), p. 29-36.
- Dold H. (1918). On pyocyanus sepsis and intestinal infections in Shanghai due to *Bacillus pyocyanus*. *Chin. Med. J.*, 32, p. 435.
- Duncan I.B.R. (1988). Waterborne *Klebsiella* and human disease. *Tox. Assess.*, 3(5), p. 581-598.
- Duncan H.E. and Edberg S.C. (1995). Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Microbiol.*, 21(2), p. 85-100.
- Dupont H.L. et al. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, 332, p. 855-859.
- Edberg S.C., Gallo P. and Kontnick C. (1996). Analysis of the virulence characteristics of bacteria isolated from bottled, water cooler, and tap water. *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, 9, p. 67-77.
- Edberg S.C., Kopps S., Kontnick C. and Escarzaga M. (1997). Analysis of cytotoxicity and invasiveness of heterotrophic plate count bacteria (HPC) isolated from drinking water on blood media. *J. Appl. Microbiol.*, 82(4), p. 455-461.
- Edberg S.C. and Allen M.J. (2002a). Virulence and risk of HPC bacteria in human population groups. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.

- Edberg S.C. and Allen M.J. (2002b). Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model. Accepted pour publication dans *Crit. Rev. Microbiol.*
- EC (1980). Council Directive relating to the quality of water intended for human consumption (80/778/EEC). *Official Journal of the European Community*, L229, (30.08.80), 11-29.
- Engelhart S., Glasmacker A., Kaufmann F. and Exner M. (2001). Protecting vulnerable groups in the home: the interface between institutions and the domestic setting. *J. Infect.*, 43, p. 57-59.
- Falkinham III J.O. (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, p. 177-215.
- Falkinham III J.O., Norton C.D. and LeChevallier M.W. (2001). Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(3), p. 1225-1231.
- Farmer J.J., Arduino M.J. and Hickman-Brenner F.W. (1992). The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Balows A., Trüper G., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K.H. (eds.) «The prokaryotes, 2nd edition», Springer-Verlag, New-York.
- Faruque S.M., Albert M.J. and Mekalanos J.J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, p. 1301-1314.
- Ferley J.P., Zmirou D., Collin J.F. and Charrel M. (1986). Etude longitudinale des risques liés à la consommation d'eaux non conformes aux normes bactériologiques. *Rev. Epidemiol. Santé Publique*, 34, p. 89-99.
- Fliermans C.B. (1996). Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with a little wisdom. *Microbiol. Ecol.*, 32, p. 203-228.
- Fricke C.R. (2002). The presence of bacteria in water after regrowth. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Galassi L. et al. (2002). Evaluation of the possible correlation between heterotrophic plate count and presence of non tuberculous mycobacteria in drinking water. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Gerba C.P., Rose J.B. and Haas C.N. (1996). Sensitive populations: who is at the greatest risk? *Int. J. Food Microbiol.*, 30, p. 113-123.
- Glasmacher A., Engelhart S. and Exner M. (2002). Protection of immunocompromised patients from waterborne infections: risk definitions, preventive measures and the need for simple screening methods to protect immunocompromised patients. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Gosling P.J. (1996). Pathogenic mechanisms. In: Austin B. et al. (eds.) «The genus *Aeromonas*», Wiley, London, p. 245-265.

- Guillot E. and Leclerc H. (1993). Bacterial flora in natural mineral waters: characterization by ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns. *Syst. Appl. Microbiol.*, 16, p. 483-493.
- Haas C.N. (1983). Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *Am. J. Epid.*, 118, p. 573-582.
- Hacker J. and Kaper J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, p. 641-679.
- Hänninen M.L. (1994). Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, p. 455-462.
- Hardalo C. and Edberg S.C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.*, 23, p. 47-75.
- Havelaar A.H., Versteegh J.F.M. and During M. (1990). The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in the Netherlands. *Zentralb. Hyg.*, 190, p. 236-256.
- Havelaar A.H. et al. (1992). Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, p. 435-444.
- Hellard M.E., Sinclair M.I., Forbes A.B. and Fairley C.K. (2001). A randomized blinded controlled trial investigating the gastrointestinal health effects of drinking water quality. *Environ. Health Perspect.*, 109, p. 773-778.
- Herman-Taylor J. et al. (2000). Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Can. J. Gastroenterol.*, 14, p. 521-539.
- Holmberg S.D. et al. (1986). *Aeromonas* intestinal infections in the United States. *Ann. Int. Med.*, 105, p. 683-689.
- Horsburgh C.R. et al. (1994). Environmental risk factors for acquisition of *Mycobacterium avium* complex in persons with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 170, p. 362-367.
- Hunter P.R. (2002). Epidemiological evidence of disease linked to HPC bacteria. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Ingram M. (1977). The significance of index and indicator organisms in foods. Presented at Int. Symp. IUMS Comm. Food Microbiol. Hygiene, 10th, Szczecin, Poland. *Lancet*, 2, p. 1425.
- Isenberg H.D. (1988). Pathogenicity and virulence: another view. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1, p. 40-53.
- Janda J.M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4, p. 397-410.

- Janda J.M. and Abbott S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.*, 27, p. 332-344.
- Kirov S.M. (1993). The public health significance of *Aeromonas* sp. in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, p. 179-198.
- Kjelleberg S. (1993). Starvation in bacteria. Plenum Press, New-York and London.
- Krovacek K. et al. (1989). Enterotoxigenicity and drug sensitivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from well water in Sweden: a case study. *Int. J. Food Microbiol.*, 8, p. 149-154.
- Krovacek K. et al. (1992). Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Food Microbiol.*, 9, p. 215-222.
- Kuijper E.J. et al. (1989). Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* sp. *J. Clin. Microbiol.*, 27(1), p. 132-138.
- LeChevallier M.W. et al. (2001). Occurrence and control of *Mycobacterium avium* complex. AWWA Research Foundation and American Water Works Association. Denver, CO., p. 1-115.
- LeChevallier M.W. (2002). Conditions favoring bacterial growth in drinking water and on water-contact surfaces. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC bacteria in drinking water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Leclerc H. (1990). Les qualités bactériologiques de l'eau minérale d'Evian. In: *L'eau Minérale d'Evian*. P. 27. S.A. des Eaux Minérales d'Evian, France.
- Leclerc H. (1995). Le complexe *Mycobacterium avium*. *Rev. Méd. Interne.*, 16, p. 99-101.
- Leclerc H. (2002). Relationships between water bacteria and pathogens in drinking water. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC bacteria in drinking water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Leclerc H. and Buttiaux R. (1962). Fréquence des *Aeromonas* dans les eaux d'alimentation. *Ann. Inst. Pasteur.*, 103, p. 97-100.
- Leclerc H. and da Costa M.S. (1998). The microbiology of natural mineral waters. In *Technology of bottled water* (Senior D.A.G. and Ashurst P., Eds.) p. 223-274. Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Leclerc H. and Moriametz J.C. (1980). Etude quantitative de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Path. Biol.*, 28(4), p. 217-226.
- Leclerc H. and Moreau A. (2002). Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, p. 207-222.
- Leclerc H., Mossel D.A.A., Edberg S.C. and Struijk C.B. (2001). Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, p. 134-201.

- Leclerc H., Schwartzbrod L. and Dei Cas E. (2002). Microbials agents associated with waterborne diseases. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28 (4), p. 371-409
- Lee J.V. and West A.A. (1991). Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, p. 121S-129S.
- Lepow M.L. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection of the gastrointestinal tract. In Baltch A.L. and Smith R.P. (eds.) «*Pseudomonas aeruginosa infections and treatment*», Marcel Dekker, New York, p. 421-440.
- Levine M.M. et al. (1988). Volunteers studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. *Infect. Immun.*, 56, p. 161-167.
- Lye D.J. and Dufour A.P. (1991). A membrane filter procedure for assaying cytotoxic activity in heterotrophic bacteria isolated from drinking water. *J. Appl. Bact.*, 70, p. 89-94.
- Moine P. (2002). L'infection nosocomiale. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 17(1), p. 8-15.
- Montecalvo M.A. et al. (1994). Colonisation of potable water with *Mycobacterium avium* complex in homes of HIV-infected patients. *Lancet.*, 343, p. 1639.
- Morgan D.R. et al. (1985). Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infect. Immun.*, 50, p. 62-65.
- Morita, R.Y. (1997). Bacteria in oligotrophic environments. Starvation-survival lifestyle, Chapman and Hall, New-York, 529 p.
- Mossel D.A.A. and Struijk C.B. (2002). Assessment of the microbial integrity, sensu G.S. Wilson, of piped and bottled drinking water in the condition as ingested. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Nichols G.L., Holt D. and Said B. (2002a). Identifying and examining information on emerging water borne pathogens. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Nichols G.L., Hunter P.R. and Said B. (2002b). Epidemiological methods for linking water and disease. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC bacteria in drinking water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Oliver J.D. (1993). Formation of viable but nonculturable cells. In Kjelleberg S. (ed.) «*Starvation in bacteria*», Plenum Press, New York, p. 239-272.
- Payment P. (2002). The history and use of HPC. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Payment P., Fanco, E., Richardson L., Siemiatycki J. (1991a). Gastrointestinal health effects associated with the consumption of drinking water produced by point-of-use domestic reverse-osmosis filtration units. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, p. 945-948.

- Payment P. et al. (1991b). A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to the consumption of drinking water meeting currently accepted microbiological standards. *Am. J. Public Health*, 81, p. 703-708.
- Payment P., Coffin E. and Paquette G. (1994). Blood agar to detect virulence factors in tap water heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, p. 1179-1183.
- Payment P. et al. (1997). A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.*, 7, p. 5-31.
- Reasoner D.J. (1990). Monitoring heterotrophic bacteria in potable water. In *Drinking Water Microbiology* (Mc Feters G.A., ed.) p. 452-477, Springer B Verlag, New York, Inc.
- Riffard S. et al. (1998). Species identification of *Legionella* via intergenic 16S-23S ribosomal spacer PCR analysis. *Int. Syst. Bacteriol.*, 48, p. 723-730.
- Ristola M.A. et al. (1999). High rates of disseminated infection due to non-tuberculous mycobacteria among AIDS patients in Finland. *J. Infect.*, 39, p. 61-67.
- Savage D.C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31, p. 107-133.
- Schubert R.H.W. (1991). Aeromonads and their significance as potential pathogens in water. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, p. 131S-135S.
- Schubert R.H.W. and Blum K.H. (2002). Standard plate count (HPC) and its relation to the occurrence of *P. aeruginosa*, *Aeromonas* sp. and endospores of aerobic bacilli in drinking water quality. Presented at the NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22-24, Geneva, Switzerland.
- Singh N. and Yu V.L. (1994). Potable water and *Mycobacterium avium* complex in HIV patients: is prevention possible? *Lancet*, 343, p. 1110.
- Smith T. (1934). Parasitism and disease. Hafner Publishing Co, New York, N.Y.
- Smith B.G., Lye D.J. and Messer J.W. (2001). Occurrence of heterotrophic bacteria with virulence characteristics in potable water, poster Q-412, 100th Ann. Conf. Amer. Soc. For Microbiol., Orlando, FL.
- Stelma G.N., Johnson C.H. and Spaulding P. (1986). Evidence for the direct involvement of β -hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. *Curr. Microbiol.*, 14, p. 71-77.
- Swanson M.S. and Hammer B.K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, p. 567-613.
- Tison D.L. et al. (1980). Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (Cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, p. 456-459.
- Vachée A., Vincent P., Struijk C.B., Mossel D.A.A. and Leclerc H. (1997). A study of the fate of the autochthonous bacterial flora of still mineral waters by analysis of restriction fragment length polymorphism of genes coding for rRNA. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20, p. 492-503.

- Von Graevenitz A. (1977). The role of opportunistic bacteria in human disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, p. 447-471.
- Von Reyn C.F. et al. (1994). Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet*, 343, p. 1137.
- Wadowsky R.M. and Yee R.B. (1985). Effect of non-Legionellaceae bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, p. 1206-1210.
- WHO (2002a). Guidelines for drinking-water quality. 2nd ed. Addendum microbiological agents in drinking water. Genève.
- WHO (2002b). Heterotrophic plate count measurement in drinking water safety management. WHO/SDE/WSH/02.10. Report of an expert meeting, Geneva, 24-25 April.
- Wolinsky E. (1979). Non tuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 119, p. 107-159.
- Yu V.L. (1993). Could aspiration be the major mode of transmission of Legionnaires' disease. *J. Infec. Dis.*, 147, p. 362.
- Zmirou D., Ferley J.P., Collin J.F., Charel M. and Berlin J. (1987). A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. *Am. J. Public Health*, 77, p. 582-584.