

SympoLegio

Lyon - 15 et 16 novembre 2011

Legionella de l'environnement à l'homme

15 et 16 novembre 2011

Colloque à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon
Amphithéâtre Charles Mérieux
46 allée d'Italie
69 364 LYON Cedex 07

LYON

■ 8H30 - 9H30 : **ACCUEIL**

9H30 - 9H35 : **Introduction - Ouverture des journées** : Jérôme ETIENNE.

Session 1. ÉPIDÉMIOLOGIE ET DIAGNOSTIC DES LÉGIONELLOSES

Modérateurs : Didier CHE et Philippe VANHEMS

9H35 - 10H00 : **Julien BEAUTE** (ECDC, Stockholm, Suède). Surveillance des légionelloses en Europe.

10H00 - 10H25 : **Christine CAMPESE** (InVS, St Maurice). Caractéristiques épidémiologiques des cas de légionelloses en 2010 en France.

10H25 - 10H45 : **Sophie RAGUET** (Strasbourg). Surveillance de la légionellose en Alsace de 2004 à 2010 : sur-occurrence de cas sporadiques et épisodes de cas groupés.

10H45 - 11H00 : **Max Maurin** (Grenoble). Intérêt diagnostique et pronostique de la PCR en temps réel chez les patients atteints de légionellose.

■ 11H00 - 11H30 : **PAUSE - SESSION POSTER**

Session 2. LEGIONELLA ET LÉGIONELLOSE

Modérateurs : Max MAURIN et Sophie JARRAUD

11H30 - 11H50 : **Ghislaine DESCOURS et Claire BERNARD** (Lyon). Présentation de cas cliniques.

11H50 - 12H20 : **Florence ADER et Yvan JAMILLOUX** (Lyon). Interaction de *L. pneumophila* avec le Système Nerveux Central.

12H20 - 12H50 : **Jean-Marc BERJEAUD** (Poitiers). Mode d'action de peptides anti-*legionella*.

■ 12H50 - 14H30 : **DÉJEUNER - SESSION POSTER**

Session 3. SUIVI ET MAÎTRISE DES SITES À RISQUES DE LÉGIONELLES

Modérateurs : Fabien SQUINAZI et Yannick PAVAGEAU

14H30 - 14H55 : **Rémi POIRIER** (ANSES, Paris). Méthodes de dénombrement des légionelles dans l'eau.

14H55 - 15H20 : **Séverine ALLEGRA** (Saint-Etienne). Viabilité des légionelles dans l'environnement : quelques outils d'analyse.

15H20 - 15H40 : **Carole GUILLAUME** (Boulogne) et **Marie BINET** (Chatou) : *Legionella* FISH-ScanRDI™ : une méthode rapide et performante pour le suivi des légionelles dans les réseaux d'eau. Intercomparaison avec l'immunofluorescence, la PCR quantitative, la PCR viable et la méthode culturale.

15H40 - 16H00 : **Marguerite NDAYO WOUAFO** (Yaoundé, Cameroun). Surveillance multicentrique de la contamination par *legionella* des eaux des établissements publics en zone tropicale.

SympoLegio

Mardi 15 Novembre (suite)
PROGRAMME

Lyon - 15 et 16 novembre 2011

■ 16h00 - 16h30 : PAUSE - SESSION POSTER

Modérateurs : Danièle ATLAN et Jacques FRERE

- 16h30 - 16h50 : **Marie Cécile TROUILHE** (Nantes). Détection et quantification des amibes libres dans les réseaux d'eau chaude pour l'anticipation du risque légionelle.
- 16h50 - 17h10 : **Delphine JAKUBEK** (Paris). Mise en place et validation d'un protocole de détermination de la sensibilité des légionelles à la monochloramine.
- 17h10 - 17h35 : **Sophie PECASTAINGS** (Toulouse). Nouveaux aspects du mode de vie sessile de *L. pneumophila*.
- 17h35 - 17h55 : **Cécile MAURICE-BLANC** (Le-Bourget-du-Lac). Effet des changements de température de l'eau sur la présence de *L. pneumophila* dans un biofilm : étude expérimentale.

■ 20h00 - 23h15 : DÎNER À LA CHAPELLE DE LA TRINITÉ

SympoLegio

Mercredi 16 Novembre
PROGRAMME

Lyon - 15 et 16 novembre 2011

■ 8h30 - 9h00 : ACCUEIL

Session 4. GÉNOMIQUE ET ÉVOLUTION DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* ET DU GENRE *LEGIONELLA*.

Modérateurs : Carmen BUCHRIESER et Gérard LINA

- 9h00 - 9h30 : **Carmen BUCHRIESER** (Institut Pasteur, Paris). *Comparative genomics and evolution of virulence of L. pneumophila and L. longbeachae.*
- 9h30 - 10h00 : **Mireia COSCOLLA** (Basel, Suisse). *Genomics and population structure in Legionella pneumophila.*
- 10h00 - 10h30 : **Christophe GINEVRA** (Lyon). Les systèmes CRISPR/cas chez *Legionella pneumophila*.
- 10h30 - 10h50 : **Laura GOMEZ-VALERO** (Institut Pasteur, Paris). *Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the Legionella pneumophila genomes.*

■ 10h50 - 11h30 : PAUSE - SESSION POSTER

Session 5. *LEGIONELLA*, BACTÉRIE INTRACELLULAIRE ET SES HÔTES EUCARYOTES.

Modérateurs : Patricia DOUBLET et Yann HECHARD

- 11h30 - 12h00 : **Gilbert GREUB** (Lausanne, Suisse). Rôle pathogène et biologie de *Parachlamydia* : cross-talks avec les légionelles.
- 12h00 - 12h20 : **Anne VIANNEY** (Lyon). Rôle du di-GMPc dans le contrôle des étapes précoces de l'infection de *L. pneumophila*.
- 12h20 - 12h40 : **Elisabeth KAY** (Grenoble). *Nucleoid-associated proteins control stress adaptation and virulence traits in Legionella pneumophila.*

■ 12h40 - 14h30 : DÉJEUNER - SESSION POSTER

Modérateurs : François VANDENESCH et Florence ADER

- 14h30 - 15h00 : **Michael STEINERT** (Braunschweig, Allemagne). *Legionella interaction sites in the alveoli.*
- 15h00 - 15h30 : **Cyril GUYARD** (Toronto, Canada). *Lcl of Legionella pneumophila is an immunogenic GAG binding adhesin that promotes interactions with lung epithelial cells and plays a crucial role in biofilm formation.*
- 15h30 - 16h00 : **Patricia DOUBLET** (Lyon). La protéine kinase LegK2, un effecteur du SST4 de *Legionella pneumophila* impliqué dans le recrutement du réticulum endoplasmique et dans la réplication intracellulaire.
- 16h00 - 16h10 : **Remise du prix de la meilleure communication (poster ou orale) et Conclusion.**

Comité local d'organisation



J. Etienne



S. Jarraud



H. Meugnier



Le secrétariat :
Y. Lakehal, I. Bregeron et
V. Buchwalter



Le soutien logistique :
Y. Benito et M. Reyrolle

Comité scientifique



F. Ader



D. Atlan



P. Berthelot



C. Buchrieser



D. Che



Y. Hechard



S. Jarraud



G. Lina



M. Maurin



F. Squinazi



P. Vanhems

Bienvenue à SympoLegio 2011 : *Legionella* de l'environnement à l'homme.

Cher(es) collègues et ami(e)s

C'est un honneur et un grand plaisir de vous accueillir à LYON pour cette deuxième édition du SympoLegio.

Une nouvelle dénomination pour ce colloque consacré à « *Legionella* : de l'environnement à l'homme » mais un objectif identique, maintenir le dynamisme national sur ce sujet. Après sa franche réussite en 2007 en terme de programme et de participation (plus de 200 participants), SympoLegio 2011 promet d'être, lui aussi, un succès. La transdisciplinarité reste au centre du programme avec des intervenants et des participants issus de la santé publique, de la microbiologie clinique et environnementale et des sciences plus fondamentales. Les travaux présentés traiteront d'épidémiologie et de diagnostic des légionelloses, du suivi et de la maîtrise des sites à risque de légionelles, des secrets et de l'évolution des génomes, et des relations de *Legionella* avec ses hôtes eucaryotes.

Ce SympoLegio 2011 est également marqué par l'accueil d'intervenants et de participants provenant de différents pays (Suisse, Suède, Cameroun, Cambodge, Allemagne, Canada, Tunisie, Maroc, Côte d'Ivoire, France). Si la francophonie reste dominante, nous accueillons cette année quelques interventions en anglais.

Nous espérons que vous trouverez au cours de ces deux jours matière à vous enrichir, échanger et initier de nouvelles collaborations au grès notamment des pauses (café et repas) régulièrement distillées. Nous profitons de cet instant pour remercier et exprimer toute notre reconnaissance à nos parrains et sponsors qui ont contribué à la réalisation du SympoLegio 2011.

Bienvenue à tous et merci de votre participation.

Le Comité d'Organisation

LEGIONELLES
Centre National de Référence

Communications orales

La surveillance de la maladie des Légionnaires en Europe.



J. BEAUTÉ

Julien BEAUTÉ ¹

¹ Centre Européen de Prévention et Contrôle des Maladies (ECDC), 171 83 Stockholm, Suède
julien.beaute@ecdc.europa.eu

Depuis 1986, un groupe de travail européen (EWGLI) facilite la collaboration internationale sur la maladie des Légionnaires et en rapporte les cas depuis 1996. En 2010, la coordination de ce groupe a été confiée à l'ECDC et a changé de nom pour devenir le réseau européen de surveillance de la maladie des Légionnaires (ELDSNet). Ce réseau est constitué d'épidémiologistes et de microbiologistes issus des 27 pays de l'Union Européenne (UE), d'Islande et de Norvège et nommés par leur autorité nationale. Les objectifs de la surveillance étaient (1) de suivre l'épidémiologie de la maladie des Légionnaires dans le temps tant pour les cas communautaires que les cas liés au voyage ou nosocomiaux (2) de collecter des données microbiologiques (3) de promouvoir le développement d'un réseau de laboratoires (4) de mettre en place des formations pour les professionnels.

Les cas de maladie des Légionnaires sont définis comme confirmés ou probables selon la définition de l'UE. Un cluster de cas liés au voyage est défini comme au moins deux cas ayant séjourné dans le même hébergement en moins de deux ans. La surveillance a été mise en place selon deux modalités : (1) le recueil rétrospectif des cas notifiés par les États membres lors de l'année précédente à travers la base de données européenne TESSy; (2) la surveillance quotidienne des cas liés au voyage et la notification des sites associés.

En 2010, 6 296 cas ont été notifiés en Europe, soit 12 cas/million d'habitants. Relativement stable depuis 2005, ce taux de notification était très variable selon les pays (quasi nul en Estonie, proche de 30/million en Slovénie). L'Espagne, la France et l'Italie représentaient près des deux tiers des cas. Plus de 70%

des cas étaient des pneumonies communautaires, 20% des cas liés aux voyages et moins de 10% survenaient dans des établissements de santé. Le taux de létalité était de 10% avec un risque accru chez les personnes âgées, pour les cas survenant lors de la saison froide et dans les établissements de santé. Le diagnostic était réalisé par la mise en évidence de l'antigène urinaire dans 80% des cas et seuls 10% des cas étaient confirmés par culture. La surveillance quotidienne a permis la notification de 100 clusters dont 44% n'auraient pu être détectés sans le réseau.

ELDSNet est le réseau international le plus important au monde pour la maladie des Légionnaires. Les cas restent toutefois largement sous-diagnostiqués et sous-reportés en Europe. D'importance disparités existent entre les pays, notamment en ce qui concerne les capacités des laboratoires.

Caractéristiques épidémiologiques des cas de légionellose en 2010 en France.



C. CAMPÈSE

Christine CAMPÈSE¹, Sophie JARRAUD² et Didier CHE¹

¹ Institut de veille sanitaire 12, rue du Val d'Osne, 94415 Saint Maurice cedex

² Centre national de référence des légionelles, Lyon, France

c.campese@invs.sante.fr

Depuis 2005, une diminution régulière du taux d'incidence de la légionellose en France s'était amorcée. En 2010, la tendance s'est inversée avec 1540 cas déclarés soit une augmentation de 28% par rapport à 2009. En 2010, le taux d'incidence en France métropolitaine était de 2,4 cas pour 100 000 habitants et était proche de celui de 2005 (2,5/10⁵). Comparé à 2009, l'augmentation a été particulièrement marquée en janvier (+117%) et pendant les mois d'août et septembre (+73%). Le gradient Ouest-Est du taux d'incidence régionale, déjà constaté les années précédentes, s'est accentué avec des taux d'incidence élevés en France Comté et en Alsace où de nombreux cas groupés ont été investigués. Les caractéristiques des cas au cours de la période 2005-2010 n'ont pas changé. En 2010, l'âge médian était de 62 ans, le sexe-ratio homme/femme de 3,2 et la létalité de 11,7%. La majorité des cas (96%) a été diagnostiquée par un test de détection urinaire et une souche a été isolée chez 282 cas (18%). Pour 44 cas (16%), la souche humaine a pu être comparée aux souches environnementales isolées d'un lieu fréquenté par le malade, et pour 25 cas (1,6% de la totalité des cas), les profils génomiques se sont révélés identiques. Une exposition à risque était rapportée pour 34% des cas et pour la moitié d'entre eux, il s'agissait d'une exposition lors d'un voyage. Aucune épidémie (plus de dix cas) n'a été identifiée en 2010 mais de nombreux cas groupés ont été investigués. La réactivité des partenaires impliqués dans la surveillance pour prévenir les cas groupés par des investigations rapides et systématiques a probablement limité le nombre de cas groupés, mais cela n'a pas permis, dans la plupart des cas, d'identifier les sources de contamination.

Par ailleurs, lors de ces investigations, bien que les cas soient regroupés dans l'espace et le temps, les analyses génotypiques des souches cliniques disponibles présentaient quelquefois des profils différents. Dans ce contexte, il est difficile de déterminer si tous les cas sont liés à une source commune de contamination ou s'il existe parmi eux, des cas sporadiques concomitants. Il est donc nécessaire de disposer au maximum de souches cliniques qui permettent par les analyses génotypiques de confirmer le caractère groupé des cas et de documenter les sources de contamination.

L'augmentation du nombre de cas en France, et l'accentuation du gradient Ouest Est, peuvent être dues à des variations climatiques et météorologiques différentes selon les régions. Il est probable que le taux d'humidité et la température influencent la survie et la dispersion des légionelles dans l'atmosphère et aient indirectement un impact sur les niveaux d'incidence observés. Il est aussi possible que de nouvelles sources d'expositions existent (type dry-cooler...) et il est donc important d'améliorer la documentation de leurs caractéristiques pour anticiper les risques et améliorer les investigations. Par ailleurs, l'étude en cours sur l'exhaustivité du système de surveillance par région et sur les pratiques de diagnostic permettra peut être d'expliquer quelques disparités régionales.

Des études sont encore nécessaires pour mieux comprendre les déterminants de la survenue des légionelloses et aider l'ensemble des partenaires à améliorer le contrôle et la prévention de cette maladie.

Surveillance de la légionellose en Alsace de 2004 à 2010 : sur-incidence de cas sporadiques et épisodes de cas groupés.



S. RAGUËT

S. RAGUËT¹, J. MOUQUET², C. DELHOSTAL³, C. CAMPÈSE⁴ et C. MEFFRE⁵

¹ Cire Lorraine-Alsace, Agence régionale de santé d'Alsace. Cité administrative Gaujot. 14, rue du Maréchal Juin. 67 084 Strasbourg. ² Pôle santé et risque environnementaux, ARS Alsace. ³ Pôle veille et gestion des alertes sanitaires, ARS Alsace.

⁴ Département des maladies infectieuses, Institut de veille sanitaire. ⁵ Cire Lorraine-Alsace, Institut de veille sanitaire
sophie.raguët2@ars.sante.fr

Depuis 2004, l'Alsace est caractérisée par une incidence de légionellose forte et par la survenue d'épisodes de cas groupés. Afin de documenter cette situation épidémiologique particulière, la Cire Lorraine-Alsace a réalisé une analyse des données de surveillance sur la période 2004-2010. Les comparaisons de fréquences ont été effectuées par le test exact de Fischer au seuil de 5%. Pour les années 2009-2010, l'incidence a été calculée par standardisation indirecte sur l'âge et le sexe. Un épisode de cas groupés a suivi la définition du guide d'investigation et d'aide à la gestion du conseil supérieur d'hygiène publique de France de 2005.

L'incidence brute de la légionellose en Alsace est supérieure à l'incidence nationale depuis 2004 et atteint le double de celle-ci à partir de 2008. En 2010, 96 cas ont été notifiés en Alsace, soit une augmentation du nombre de cas de 45% par rapport à 2009 et un taux d'incidence standardisé de 5,4 cas/100 000 habitants, IC95%: [4,3-6,5]. Cette recrudescence a connu un pic au mois de décembre qui a concentré 24% des cas annuels (6,9 % en 2004-2009, p<0,001). De 2004 à 2010, les caractéristiques des cas déclarés en Alsace ne différaient pas de celles des cas déclarés au niveau national. En revanche une souche clinique a été isolée dans près de 25% des cas.

En 7 ans, 15 épisodes de cas groupés (2 à 3 par an) impliquant 47 cas (2 à 12 par épisodes) ont été investigués dans la région. Plus de la moitié des épisodes (53%) sont survenus en période estivale (juillet-septembre). Parmi ces épisodes, 8 (53%) sont survenus dans l'agglomération de Strasbourg. Par ailleurs,

pour 8 des 15 épisodes (53%) au moins 2 souches cliniques ont été isolées et envoyées au CNR. Dans 2 épisodes sur 8, des souches cliniques identiques ont été retrouvées. Pour les 6 autres, les souches étaient différentes entre elles. Dans 8 épisodes sur 15 (53%), une aéro-réfrigérante (TAR) a été suspectée comme source de contamination. Selon les épisodes, les investigations ont identifié une ou plusieurs TAR contaminées avec des concentrations de *Legionella pneumophila* supérieures à 1000 UFC/L. Cependant la comparaison des souches cliniques et environnementales n'a pas permis de retrouver l'origine de la contamination.

L'Alsace présente une sur-incidence de légionellose depuis plusieurs années malgré des efforts entrepris localement pour prévenir cette maladie. Même si cet excès de cas pourrait être du -en partie- à une meilleure notification et à de bonnes pratiques diagnostiques, cela n'explique pas l'augmentation du nombre de cas sporadiques enregistrée en décembre 2010, ni la persistance des épisodes de cas groupés. Près de la moitié de ces épisodes ont probablement impliqué une TAR contaminée, mais l'identification formelle de la source de contamination par comparaison de souches cliniques et environnementales n'a jamais été possible. Les interrogations sur les déterminants à l'origine de ces augmentations demeurent.

Intérêt diagnostique et pronostique de la PCR en temps réel chez les patients atteints de légionellose.



M. MAURIN

Lubana SHADOU^{1,2}, Christine RECOLE¹, Isabelle PELLOUX¹, Jacques CROIZÉ^{1,2} et Max MAURIN^{1,2}

¹ Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et Pathologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France

² LAPM, UMR CNRS 5163, UJF-Grenoble 1, Grenoble, France

mmaurin@chu-grenoble.fr

La technique de PCR en temps réel offre la possibilité de détecter des agents pathogènes dans les prélèvements cliniques à visée diagnostique, mais également de les quantifier dans un but pronostique. Nous avons tenté d'appliquer ce principe chez 114 patients hospitalisés pour légionellose au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble entre 2003 et 2010, ces infections étant pour la plupart d'origine communautaire. Le diagnostic de légionellose était considéré comme confirmé, chez un patient présentant des symptômes de pneumonie, en cas d'isolement d'une souche de *Legionella* sp. à partir des sécrétions respiratoires et/ou de positivité d'un test urinaire (Binax, Portland, ME, USA) permettant la détection de l'antigène de *L. pneumophila* de sérotype 1. Deux tests de PCR en temps réel, ciblant soit le gène codant pour l'ARNr16S soit le gène mip, ont été testés sur différents prélèvements des voies ariennes inférieures réalisés chez les patients lors de leur admission.

Le diagnostic de légionellose a été confirmé par un test Binax positif chez les 114 (100%) patients de notre série et par isolement d'une souche de *L. pneumophila* de sérotype 1 chez 22 (19,3%) patients. Les tests de PCR en temps réel étaient positifs chez 87 patients, soit une sensibilité de 76,3% par rapport au diagnostic de référence. La charge bactérienne à l'admission des patients variait de 1 à 4,49 10⁶ copies de génome de *L. pneumophila* pour 5µL d'extrait ADN obtenu à partir de prélèvements des voies aériennes inférieures de ces patients. L'analyse des données obtenues montre une corrélation significative (test t de Student, $p \leq 0,05$) entre une charge bactérienne initiale élevée et la gravité de la pneumonie, avérée

par un score de Fine élevé, la nécessité d'une admission en réanimation, et une hospitalisation prolongée.

La PCR en temps réel représente un outil diagnostique et pronostique d'intérêt au cours de la légionellose. Sa sensibilité est cependant influencée par la qualité des sécrétions respiratoires analysées.

Cas cliniques de pneumopathies sévères à *Legionella pneumophila*.

(1) Légionellose sévère chez un sujet jeune immunocompétent. Prise en charge par ECMO et chirurgie thoracique.



G. DESCOURS

G. DESCOURS^{1,2}, C. FLAMENS³, F. PHILIT⁴, F. TRONC⁵, M. CÉLARD¹, O. BASTIEN³, G. LINA^{1,2} et S. JARRAUD^{1,2}

¹ Laboratoire de Bactériologie, Institut de Microbiologie, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, France

² Centre National de Référence des Légionelles, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon – Université Lyon 1, Lyon

³ Service de Réanimation Médicale, Hôpital Cardiologique, Hospices Civils de Lyon, France

⁴ Service de Pneumologie, Hôpital Cardiologique, Hospices Civils de Lyon, France

⁵ Service de Chirurgie Thoracique, Hôpital Cardiologique, Hospices Civils de Lyon, France

Les infections à *Legionella* constituent un diagnostic différentiel des pneumonies de l'adulte. Nous rapportons un cas de légionellose gravissime à *Legionella pneumophila* sérotype 1 chez un sujet jeune immunocompétent. Le diagnostic par détection de l'antigène urinaire a été porté après 5 jours d'antibiothérapie par amoxicilline. Le patient présentait alors une défaillance cardio-respiratoire, nécessitant une prise en charge en réanimation par ECMO (ExtraCorporeal Membrane Oxygenation). Malgré une antibiothérapie adaptée, l'état respiratoire du patient restait précaire et la culture des prélèvements respiratoires demeurait positive à *L. pneumophila* après 35 jours de traitement. Aucune antibiorésistance n'était observée. La guérison fut obtenue après drainage chirurgical d'un abcès pulmonaire co-infecté par *L. pneumophila* et *Fusobacterium nucleatum*. Le patient fut extubé après 60 jours de réanimation, puis muté en service de pneumologie. L'antibiothérapie était poursuivie pour une durée totale de 3 mois. Le scanner montrait une restitution *ad integrum* du parenchyme pulmonaire.

Le retard au diagnostic de légionellose entraîne une morbidité importante. La persistance d'une culture positive à *Legionella* dans des prélèvements respiratoires malgré une antibiothérapie adaptée doit faire évoquer l'existence d'un abcès pulmonaire.

Cas cliniques de pneumopathies sévères à *Legionella pneumophila* (suite).

(2) Pneumonie nécrosante révélant une co-infection entre *Legionella pneumophila* et *Staphylococcus aureus* producteur de leucocidine de Panton Valentine : à propos d'un cas.



C. BERNARD

C. BERNARD¹, **S. JARRAUD**^{1,2}, **A. TRISTAN**^{1,3}, **G. LINA**^{1,2}, **R. HERNU**⁴, **F. VANDENESCH**^{1,3}, **J. ETIENNE**^{1,2,3} et **L. ARGAUD**⁴

¹Laboratoire de Bactériologie, Institut de Microbiologie, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, France

²Centre National de Référence des Légionelles, Lyon, France

³Centre National de Référence des Staphylocoques, Lyon, France

⁴Service de Réanimation Médicale, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, France

La pneumonie nécrosante à *Staphylococcus aureus* producteur de leucocidine de Panton Valentine (PVL) a été décrite comme une entité distincte. Le tableau initial typique comporte un syndrome pseudo-grippal faisant le lit de la pneumopathie nécrosante.

Nous rapportons les aspects cliniques et physiopathologiques d'un cas de co-infection à *S. aureus* producteur de PVL (PVL+) et *Legionella pneumophila* sérotype 1. Il s'agit d'une patiente de 46 ans présentant sur un terrain de néoplasie évolutive, une pneumopathie à *L. pneumophila* avec surinfection pulmonaire à *S. aureus* PVL+, d'évolution fatale.

De véritables co-infections grippe et *S. aureus* PVL+ ont été décrites, mais une co-infection *S. aureus* PVL+ / *L. pneumophila* n'a jamais été rapportée à ce jour. Un tableau clinique atypique de pneumopathie nécrosante prouvée à *S. aureus* PVL+ sur un terrain d'immunodépression sous-jacente doit faire évoquer la possibilité d'une légionellose sous-jacente et faire rechercher une co-infection.

Etude de l'interaction de *Legionella pneumophila* avec le système nerveux central.



F. ADER

Yvan JAMILLOUD et Florence ADER

INSERM U851 FINOVI 321 avenue Jean Jaures 69007 LYON

L'atteinte neurologique accompagne 40 à 50 % des légionelloses. Typiquement, elle se manifeste par une encéphalopathie parfois sévère dont la physiopathologie reste inconnue. Chez l'hôte humain, *Legionella pneumophila* infecte les macrophages et se multiplie dans une vacuole de réplication intracellulaire. Expérimentalement, les macrophages murins restreignent la croissance de *L. pneumophila* par une voie de l'immunité innée impliquant les récepteurs appelés nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), l'inflammasome NAIP5-NLRC4 et la caspase-1. Son activation conduit à la production de cytokines proinflammatoires et la mort cellulaire par pyroptose. Aucun travail ne documente la réponse innée du système nerveux central (SNC) vis-à-vis de *L. pneumophila*.

Pour tester l'hypothèse que *L. pneumophila* peut infecter les cellules microgliales (CM), macrophages résidents du cerveau, des cultures primaires de CM de souris nouveau-nées sauvages C56BL/6 (WT) ou déficientes pour l'expression de la caspase-1 (caspase-1 KO) ont été infectées avec *L. pneumophila* JR32 (JR32 WT) et le mutant isogénique aflagellé ($\Delta flaA$). Ont été analysés le taux d'infection (immunofluorescence), la croissance intracellulaire (courbes de croissance), l'activation de la caspase-1 et la pyroptose (cytométrie de flux et immunofluorescence) ainsi que la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18 et TNF- α (ELISA). *L. pneumophila* infecte productivement les CM via l'établissement d'une vacuole autonome de réplication. Les CM WT restreignent la croissance bactérienne de JR32 WT alors que $\Delta flaA$ croît exponentiellement. Les CM caspase-1 KO sont permissives à la croissance de *L. pneumophila*. Le taux d'activation de la caspase-1 est significativement

plus important chez les CM WT infectées par JR32 WT comparé à celles infectées par $\Delta flaA$ (42% vs 12%). La pyroptose mesurée est significativement plus importante après l'infection par JR32 WT qu'avec $\Delta flaA$ (30% vs 10%). La production des cytokines pro-inflammatoires caspase-1-dépendantes (IL-1 β et IL-18) est significativement plus importante avec la souche JR32 WT ($p < 0,05$). La production de TNF- α , similaire dans les groupes, indique que sa production n'est pas dépendante de la flagelline. Les résultats *ex vivo* montrent que les CM du SNC adoptent le même profil de réponse innée que les macrophages périphériques contre *L. pneumophila*. Cette réponse est dépendante de la reconnaissance de la flagelline bactérienne et emprunte la voie caspase-1 dépendante de l'inflammasome NAIP5-NLRC4.

Pour tester l'hypothèse que l'infection pulmonaire à *L. pneumophila* génère une neuroinflammation via l'activation de cette voie, des expériences *in vivo* sont actuellement menées.

Mode d'action de peptides anti-*Legionella*.



J.-M. BERJEAUD

J.-M. BERJEAUD, A. MARCHAND, C. LOISEAU, N. AUDONNET, J. VERDON, Y. HÉCHARD et C. LACOMBE

Université de Poitiers, LCME – CNRS UMR6008, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France
Jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr

S *taphylococcus warneri* RK a été identifié en 2005 comme étant actif contre *Legionella pneumophila*. Cette activité a été reliée à la sécrétion de trois peptides qui présentent également une activité hémolytique. Deux de ces peptides, les δ -lysines I et II, sont similaires (80% d'identité de séquence) à la δ -lysine de *S. aureus*. Le troisième peptide, la warnéricine RK, long de 22 acides aminés a une séquence originale. Son activité antimicrobienne est quasiment restreinte au genre *Legionella* et toutes les légionelles testées à ce jour, quelle que soit l'espèce, se sont avérées sensibles à son action.

Il a été montré que la warnéricine RK, qui adopte une structure en hélice alpha amphiphile dans les milieux mimant les membranes, est capable de perméabiliser des membranes artificielles selon un processus voltage dépendant. Le peptide forme des pores de taille variable sur des liposomes, ce qui suggère un mode d'action de type détergent comme cela a été proposé pour la δ -lysine de *S. aureus* à forte concentration.

Nous avons étudié l'influence de la composition membranaire sur la sensibilité de *L. pneumophila* à la warnéricine RK. Ainsi, il a été montré qu'une corrélation positive existe entre la teneur en acides gras branchés au niveau des lipides membranaires et la résistance au peptide. En effet, les cellules récoltées en phase stationnaire de croissance, moins sensibles à la warnéricine RK qu'en phase exponentielle, comportent un taux d'acides gras ramifiés plus important.

Plus récemment, une analyse lipidomique a permis de comparer les contenus phospholipidiques de *L. pneumophila*, sensible à la warnéricine RK, et d'*Escherichia coli* qui est totalement insensible au peptide. En parallèle la mesure de l'activité du peptide a été réalisée sur des vésicules de compositions lipidiques variées. Les

résultats obtenus ont permis de montrer que la présence de phosphatidylcholines est requise pour l'activité de la warnéricine RK.

D'autre part, diverses espèces de staphylocoques ont été testées pour leur activité anti-*Legionella* et les agents responsables de cette activité ont été purifiés et identifiés. Ces peptides ont été classés en deux groupes sur la base de leurs activités antimicrobienne et hémolytique. Le groupe 1, représenté par la warnéricine RK, correspond aux peptides bactéricides et très hémolytiques. Le second groupe, représenté par la PSM α de *S. epidermidis*, correspond à des peptides bactériostatiques et peu hémolytiques.

Afin d'essayer d'identifier des motifs structuraux spécifiquement impliqués dans l'une ou l'autre de ces activités une collection de 18 peptides modifiés à partir des séquences de la warnéricine RK et de la PSM α , a été synthétisée. Les activités, hémolytique, antibactérienne et de perméabilisation de membranes modèles de ces peptides ont ensuite été déterminées ce qui a permis de mettre en évidence certains résidus dont la modification permet de moduler ces activités. Ainsi le remplacement du résidu de glycine en position 14 de la PSM α par une lysine permet d'obtenir un peptide bactéricide, la PSM α étant bactériostatique, et très faiblement hémolytique.

En conclusion, nous avons montré que la sensibilité de *Legionella* à ces peptides de staphylocoques est dépendante de la composition membranaire bactérienne, en particulier la teneur en phosphatidylcholine. D'autre part, il semble maintenant possible de définir la séquence d'un peptide très actif contre *Legionella* mais dépourvu d'effet hémolytique.

Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau.



R. POIRIER

Rémi POIRIER¹, Claude-Olivier SARDE², Pierre ABASQ³, Séverine ALLEGRA⁴, Philippe CHANTELOUP⁵, Didier HILAIRE⁶, Sophie JARRAUD⁷, Christine LAWRENCE⁸, Pierre LE CANN⁹, Marylin LECSO¹⁰ et Fabien SQUINAZI¹¹

¹ Agence nationale de sécurité sanitaire, Unité d'évaluation des risques liés à l'eau (Maisons-Alfort) ; ² Université de Technologie de Compiègne ; ³ Laboratoire de microbiologie Environnement Santé de l'IDAC (Nantes) ; ⁴ Université Jean Monnet (Saint-Etienne) ; ⁵ Service de microbiologie environnementale du laboratoire du Conseil Général du Var (Draguignan) ; ⁶ Département toxines bactériennes du Centre d'études du Bouchet (Vert le Petit) ; ⁷ Centre National de Référence des légionelles (Lyon) ; ⁸ Equipe opérationnelle d'hygiène de l'Hôpital Raymond Poincaré (Garches) ; ⁹ Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (Rennes) ; ¹⁰ Service de Bactériologie-Hygiène du groupe hospitalier de la Pitié Salpêtrière (Paris) et Université Paris Descartes ; ¹¹ Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (LHVP).

En France, la surveillance environnementale de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* est encadrée par la réglementation qui impose l'utilisation de la méthode par culture (norme NF T90-431). L'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses) a réalisé un état des lieux des méthodes de dénombrement des légionelles et mené une réflexion sur la pertinence de leur mise en œuvre pour le contrôle réglementaire des eaux chaudes sanitaires et des tours aérorefrigérantes.

Choix de méthodes analytiques

- Afin de pouvoir les évaluer, les méthodes de dénombrement de *Legionella* ont été recensées :
- méthodes basées sur un principe unique : croissance (culture, comptage direct des cellules viables : DVC), amplification génique (amplification en chaîne par polymérase quantitative en temps réel : q-PCR, PCR Viable : v-PCR) ou affinité moléculaire (immuno-détection, hybridation *in situ* par molécules fluorescentes : FISH) ;

méthodes basées sur des principes mixtes : Immunologique double-staining (IDS), culture-FISH, DVC-FISH, Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF), Chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante (dHPLC) couplée à la PCR, Séparation immuno-magnétique (IMS) - ATP-

métrie).

Selon des critères d'évaluation préalablement définis, les méthodes présentant le plus grand nombre d'avantages théoriques sont la culture, la q-PCR et la v-PCR. Cependant certains avantages identifiés à l'échelon expérimental peuvent être pris en défaut lorsque la méthode est appliquée à large échelle comme dans le cadre de la surveillance réglementaire. Actuellement, seules les méthodes de dénombrement des *Legionella* dans l'eau par culture (normes NF T90-431 et NF EN ISO 11731-2) et par q-PCR (norme NF T90-471) offrent ces garanties. Ainsi l'Anses recommande de laisser le choix au gestionnaire d'utiliser l'une de ces deux méthodes en fonction du contexte et de la situation (surveillance de routine, urgence sanitaire, disponibilité des méthodes).

Propositions de valeurs cibles

Dans la plupart des cas de légionelloses déclarés liés à des contaminations de circuits d'eau chaude sanitaire, l'espèce responsable est *Legionella pneumophila*. Chez un patient atteint de légionellose infecté via une tour aérorefrigérante, à ce jour, aucune autre espèce n'a pu être identifiée.

Actuellement, la réglementation française impose la surveillance de *Legionella pneumophila* dans les eaux chaudes sanitaires et de *Legionella* spp. dans les

Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau.



R. POIRIER

Rémi POIRIER¹, Claude-Olivier SARDE², Pierre ABASQ³, Séverine ALLEGRA⁴, Philippe CHANTELOUP⁵, Didier HILAIRE⁶, Sophie JARRAUD⁷, Christine LAWRENCE⁸, Pierre LE CANN⁹, Marylin LECSO¹⁰ et Fabien SQUINAZI¹¹

¹ Agence nationale de sécurité sanitaire, Unité d'évaluation des risques liés à l'eau (Maisons-Alfort) ; ² Université de Technologie de Compiègne ; ³ Laboratoire de microbiologie Environnement Santé de l'IDAC (Nantes) ; ⁴ Université Jean Monnet (Saint-Etienne) ; ⁵ Service de microbiologie environnementale du laboratoire du Conseil Général du Var (Draguignan) ; ⁶ Département toxines bactériennes du Centre d'études du Bouchet (Vert le Petit) ; ⁷ Centre National de Référence des légionelles (Lyon) ; ⁸ Equipe opérationnelle d'hygiène de l'Hôpital Raymond Poincaré (Garches) ; ⁹ Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (Rennes) ; ¹⁰ Service de Bactériologie-Hygiène du groupe hospitalier de la Pitié Salpêtrière (Paris) et Université Paris Descartes ; ¹¹ Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (LHVP).

aéroréfrigérantes. Dans les cas des eaux chaudes sanitaires, l'examen de la bibliographie et les auditions d'acteurs du système de surveillance n'ont pas mis en évidence d'argument justifiant, d'un point de vue sanitaire, une modification de la cible des dénombrements. En revanche, dans le cas des tours aéroréfrigérantes, les données collectées montrent que, d'un point de vue sanitaire, il serait plus facile d'interpréter des résultats en *Legionella pneumophila*.

L'utilisation de la q-PCR pour la surveillance environnementale de *Legionella* nécessite l'élaboration de valeurs cibles, les seuls référentiels actuels étant ceux de la réglementation pour la méthode par culture. Les retours d'expérience liés à leur utilisation ne mettent pas en évidence la nécessité de les modifier. Il apparaît donc raisonnable de définir les valeurs cibles applicables à la q-PCR de manière à ce que le taux de résultats supérieurs à ces valeurs, obtenus avec une même série de prélèvement, soit équivalent pour la culture et pour la q-PCR. Les valeurs cibles proposées sont présentées dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : valeurs cibles en *L. pneumophila* proposées pour les eaux chaudes sanitaires

Population générale	Culture	q-PCR
	10 ³ UFC /L	5.10 ³ UG /L
Patients à haut risque (immunodéprimés) dans établissements de santé	Limite de détection	Limite de détection

Tableau 2 : valeurs cibles en *L. pneumophila* proposées pour les eaux des tours aéroréfrigérantes

Eau d'appoint : valeur cible	Culture	q-PCR
	Limite de quantification	Limite de quantification
Eau de l'installation :		
• valeur cible d'action	10 ³ UFC /L	5.10 ³ UG /L
• valeur cible d'arrêt	10 ⁵ UFC /L	5.10 ⁵ UG /L

L'Anses recommande néanmoins de mener une étude comparative sur différentes qualités d'eaux (Eaux chaudes sanitaires et tours aéroréfrigérantes), avec un grand nombre d'échantillons, afin de tester et le cas échéant d'affiner les valeurs cibles proposées.

1 : Norme NF T90-431 «Recherche et dénombrement de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* par culture sur milieux gélosés».

2 : Etant donné le peu d'exemples d'application de la norme NF EN ISO 11731-2 en France, les présentes recommandations sont essentiellement basées sur la norme NF T90-431.

Viabilité des légionelles dans l'environnement : quelques outils d'analyse.



S. ALLEGRA

Séverine ALLEGRA, Françoise GIRARDOT, Florence GRATARD, Thibaut EPALLE, Philippe BERTHELOT, Bruno POZZETTO et Serge RIFFARD

Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), EA 3064
Université Jean Monnet - Faculté de Médecine
15 rue Ambroise Paré, 42023 SAINT ETIENNE cedex 2, France

Les légionelles, bactéries ubiquitaires des environnements aquatiques naturels et anthropiques - dont les réseaux d'eaux chaudes sanitaires (ECS) et les tours aéro-réfrigérantes (TAR) - peuvent être responsables d'une pneumopathie sévère (légionellose). Cette pathologie se déclare après l'inhalation d'aérosols contenant des légionelles. La surveillance des taux de ces bactéries dans l'environnement est basée sur deux méthodes normalisées de détection et de quantification par culture (AFNOR NF T90-431) et par PCR (AFNOR NF T90-471). Ces deux méthodes ne permettent toutefois pas de corréler les taux de légionelles détectées à un risque infectieux celui-ci étant en partie seulement dépendant du nombre de bactéries mis en évidence dans un échantillon. En effet, chacune de ces méthodes voit sa sensibilité remise en cause par la présence, dans certains échantillons, de légionelles viables non cultivables (VBNC) et d'inhibiteurs.

Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse à l'amélioration des méthodes de détection et de quantification des légionelles ; thématique en partie soutenue par l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, anciennement AFSSET) depuis 2006. Ces travaux nous permettent aujourd'hui :

- de mettre en évidence la présence de *Legionella* VBNC dans un échantillon monomicrobien après stress thermique (1) ;
- d'étudier la résistance des *Legionella* aux traitements de décontamination des réseaux d'eaux contaminés (2) ;

- d'évaluer la pertinence d'immuno-captures (3) couplées : à la culture, à des techniques de microscopie à fluorescence, à la cytométrie en flux, à différents biocapteurs (guide d'onde et impédancemétrie) pour la détection et le tri cellulaire des *Legionella* à partir d'échantillons d'eau peu complexes (ECS).

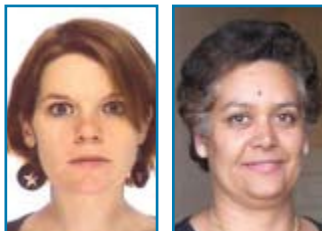
Ces méthodes devraient contribuer à : mieux caractériser l'état physiologique des légionelles dans l'environnement ; mieux cibler les actions préventives ou curatives à mettre en œuvre pour éviter la recolonisation rapide des circuits après un traitement ; lancer une alerte rapide et disposer de la souche (tri cellulaire) pour des études complémentaires (épidémiologie, résistances...) dans le contexte de prévention du « risque *Legionella* ».

1 : Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B, Riffard S. Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. Appl Environ Microbiol. 2008 Dec;74(24):7813-6.

2 : Allegra S, Grattard F, Girardot F, Riffard S, Pozzetto B, Berthelot P. Longitudinal evaluation of the efficacy of heat treatment procedures against *Legionella* spp. in hospital water systems by using a flow cytometric assay. Appl Environ Microbiol. 2011 Feb;77(4):1268-75.

3 : Allegra S, Girardot F, Grattard F, Berthelot P, Helbig JH, Pozzetto B, Riffard S. Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. J Appl Microbiol. 2011 Jan 29. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04955.x.

Legionella FISH- ScanRDI™ : une méthode rapide et performante pour le suivi des légionelles dans les réseaux d'eau. Intercomparaison avec l'immunofluorescence, la PCR quantitative, la PCR viable et la méthode culturale.



C. GUILLAUME

M. BINET

Carole GUILLAUME^{1*}, **Julia BAUDART**^{2,3*}, **Gaëlle LE MEUR**¹, **Emilie LEHERICEY**⁴, **Philippe LEBARON**^{2,3} et **Marie BINET**⁴

¹ Ajilon Engineering, Energie-Environnement, 88ter, avenue du Général LECLERC 92100 Boulogne Billancourt

² UPMC Univ Paris 06, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/mer, France

³ CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/mer, France

⁴ EDF R&D National Laboratory of Hydraulics and Environment, 6 quai Watier, 78401 Chatou cedex, France

*contribution équivalente au travail.

La légionellose est une forme de pneumopathie humaine grave et parfois mortelle. Elle est provoquée par l'inhalation d'aérosols contaminés par la bactérie *Legionella pneumophila*, et parfois par d'autres espèces de légionelles. Cette bactérie, naturellement présente à faibles concentrations dans les environnements aquatiques, peut coloniser les systèmes de distribution d'eaux et y proliférer (tours aéroréfrigérantes, réseaux de distribution d'eau...). Pour prévenir la dissémination de la bactérie, les installations sont soumises à une réglementation stricte imposant un suivi des concentrations en légionelles et une maintenance régulière des installations. La méthode de référence pour la détection et la quantification des légionelles dans l'eau (NF T90-431) est la méthode par culture sur milieu sélectif qui présente un délai d'obtention des résultats long : 10 à 12 jours.

Pour accroître la réactivité en cas de contamination des systèmes de refroidissement par des légionelles une nouvelle méthode rapide et quantitative a été développée : FISH ScanRDI™. Le dénombrement spécifique d'un échantillon d'eau brute est réalisé après culture sur filtre et hybridation fluorescente *in situ*. Les légionelles marquées sont dénombrées par un cytomètre en phase solide. L'efficacité de cette méthode et de 4 autres méthodes rapides (PCR quantitative (qPCR), PCR viable, immunocytométrie des *Legionella* totales et des *Legionella* viables) a été comparée à la méthode conventionnelle par culture (norme NF T90-431) sur des échantillons d'eau de complexité variable (système pilote, présence biocide, eau décarbonatée...).

La capacité des méthodes à donner un résultat concordant à la norme et/ou à prédire les variations de concentrations en légionelles dans les circuits a été évaluée.

La méthode de dénombrement par PCRq est rapide, spécifique et quantitative mais ne permet pas d'évaluer la viabilité des cellules du fait de la persistance de l'ADN dans les cellules après leur mort. La PCRq n'est pas une méthode pertinente dans les circuits traités par un biocide et surestime le risque d'infection. En effet, le risque véritable est limité à la fraction viable de la population de légionelles. De plus pour limiter l'inhibition de la PCR, les échantillons sont dilués entraînant une augmentation de la limite de détection de la méthode. La PCR viable, théoriquement capable de détecter les cellules viables uniquement, ne parvient pas à limiter la surestimation de la fraction viable dans nos échantillons complexes. Le dénombrement des légionelles viables ou totales par immunocytométrie ne permet pas la quantification des légionelles dans ces échantillons. Ces méthodes avaient cependant permis une bonne quantification dans les eaux potables. Seule le FISH-ScanRDI™ permet l'obtention d'un résultat présentant un faible écart à la norme ($\pm 0,5$ log) en réduisant significativement son délai d'obtention.

Notre travail souligne la nécessité de prendre en compte les paramètres de l'eau du circuit (présence de traitement biocide, composition chimique et microbiologique...) dans l'interprétation des résultats. Les compétences d'une méthode sont clairement dépendantes de la complexité de l'eau. Seule la méthode FISH-ScanRDI™ semble applicable dans toutes les situations avec des résultats étroitement liés aux résultats obtenus par la méthode de référence. La méthode peut être très utile comme outil de suivi des colonisations en légionelles des systèmes d'eau complexes.

1 : qPCR avec un pré-traitement à l'EMA - Ethidium MonoAzide agent intercalant qui entre sélectivement dans les cellules ayant une membrane altérée et se lie covalamment à l'ADN qui ne peut plus être amplifiée (Chang et al., 2009)

Surveillance multicentrique (Cambodge, Cameroun et Sénégal) de la contamination par Legionella des eaux des établissements publics.



M. NDAYO WOUAFO

Marguerite NDAYO WOUAFO¹, **Kruiy SUN LAY**², **Benoît GARIN**³, **Antoinette NGANDJIO**¹, **Guy EJENGUELE**¹, **Mame FATOU**³ et **Mame FATOU DEME**³, **V. YITH**², **D.R. MUT**², **B. H. SUY**², **J. L. SARTHOU**², **Dominique BAUDON**¹, **S. JARRAUD**⁴ et **C. BUCHRIESER**⁵

¹ Centre Pasteur du Cameroun, B.P. 1274 Yaoundé ; ² Institut Pasteur du Cambodge, N° 5 Bd Monivong, Cambodge ; ³ Institut Pasteur de Dakar- Sénégal B.P. 220 Dakar ; ⁴ CNR de Lyon, 59 Bd Pinel, 69 677 Lyon- France ; ⁵ Institut Pasteur de Paris, 25 rue du Dr ROUX 75724 Paris cedex 15 France

wouafo@pasteur-yaounde.org

Le système de distribution d'eaux des établissements publics constitue une source potentielle de contamination par les légionelles. Le risque légionelle est néanmoins peu étudié en zone tropicale. Une surveillance multicentrique de systèmes d'eaux desservant des établissements publics a été menée au Cambodge, au Cameroun et au Sénégal par les Instituts membres du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP). Son objectif était de détecter la présence des légionelles dans les systèmes de distribution d'eaux des hôpitaux et des hôtels. Six hôpitaux hébergeant des malades à risque et 6 hôtels ayant le plus grand nombre de chambres ont été sélectionnés par pays. Le prélèvement était effectué tous les 2 mois, dans les mêmes établissements et aux mêmes endroits. Les facteurs favorisant le développement des légionelles tels que la température et la turbidité étaient mesurés. Les échantillons étaient traités selon les méthodes standardisées (Norme NF 90-431).

De mai 2009 à juillet 2010, 642 échantillons d'eaux dont 216 collectés au Cambodge, 216 au Cameroun et 210 au Sénégal ont été analysés. Deux cent un échantillons (31,3%) étaient contaminés par les légionelles. Au total 227 souches ont été isolées ; 5 échantillons du Cambodge étaient contaminés par 3 espèces différentes de légionelles ; 14 autres échantillons du Cambodge et 5 du Cameroun étaient colonisés par 2 espèces différentes. La répartition des souches isolées dans les 3 pays était de 52,8% pour le Cambodge, 26,2% pour le Cameroun et 14,5% pour

le Sénégal. Les hôpitaux étaient en général moins contaminés ; 89 souches isolées des 18 établissements sélectionnés soit 48,2% pour le Cambodge, 41,6% pour le Cameroun et 10,2 pour le Sénégal. En ce qui concerne les hôtels, 138 souches étaient isolées, avec une répartition de 57,5% pour le Cambodge, 26,8% pour le Cameroun et 17,4% pour le Sénégal. La différence de contamination des eaux des hôpitaux et des hôtels était statistiquement très significative au Cambodge ($p < 0,01$), significative au Sénégal ($p < 0,5$), et non significative au Cameroun ($p > 0,5$). *Legionella pneumophila* était l'espèce la plus fréquemment isolée (83,8%) ; le sérotype 1 était majoritaire (54,2%).

Ces résultats révèlent une importante contamination des réseaux de distribution d'eaux des établissements publics dans les trois pays ayant participé à cette étude. Il serait souhaitable de sensibiliser d'avantage les pouvoirs publics et les propriétaires d'hôtels au risque de légionellose en vue de mettre en place un système de surveillance permanente. La caractérisation moléculaire des souches permettra de déterminer la parenté des souches isolées dans ces 3 pays.

Détection et quantification des amibes libres dans les réseaux d'eau chaude pour l'anticipation du risque légionelles.



M.-C. TROUILHÉ

T. LE CALVEZ¹, M.-C. TROUILHÉ², P. HUMEAU² et Y. HÉCHARD¹

¹ Laboratoire de Chimie de l'Eau et de l'Environnement, UMR-CNRS 6008, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France

² Centre Scientifique et Technique du Bâtiment, 11 rue Henri Picherit, BP 82341, 44323 Nantes cedex 3, France
marie-cecile.trouilhe@cstb.fr
yann.hechard@univ-poitiers.fr

Aujourd'hui, il est reconnu que les amibes libres jouent un rôle prépondérant dans la survie, la croissance et la dissémination des légionelles dans les environnements hydriques tels que les réseaux d'eau chaude (REC) et les tours aéroréfrigérantes (TAR). Elles constituent également un rempart de protection vis-à-vis de différents stress environnementaux (température, pH, osmolarité...) et des procédures de désinfection. Afin d'estimer au mieux le risque légionelles dans un environnement, il apparaît donc important de quantifier à la fois ces bactéries et leurs hôtes. La quantification des amibes libres par culture reste une méthode lourde et peu fiable basée sur le calcul du nombre le plus probable (NPP). De plus, les milieux de culture utilisés ne permettent pas toujours une bonne croissance des amibes ce qui entraîne une sous-estimation de la population totale. Les travaux de recherche présentés avaient pour objectif de développer une méthode de PCR quantitative (PCRq) qui permet de quantifier simultanément les principales amibes hôtes à légionelles dans les REC et les TAR. Cette méthode utilisant la chimie SYBR Green (marqueur fluorescent de l'ADN double brin) a pour cible le gène codant l'*ARNr 18S*. Elle a été testée et validée sur des ADN extraits à partir de cultures pures d'amibes. Une étude sur un banc d'essais simulant un REC à échelle réelle a également été conduite afin d'éprouver la méthode développée sur des échantillons environnementaux. Les concentrations en amibes libres et en *L. pneumophila* ont été mesurées par PCRq et par culture dans différentes conditions de fonctionnement. A partir de ces travaux, il est pos-

sible d'envisager l'établissement d'une corrélation entre les populations d'amibes libres et de *L. pneumophila* dans les REC afin de développer un indice de contamination ambiante qui permettrait d'anticiper le risque légionelles.

Mise en place et validation d'un protocole de détermination de la sensibilité des légionelles à la monochloramine.



D. JAKUBEK

D. JAKUBEK^{1,2}, C. GUILLAUME³, M. BINET¹, G. LEBLON², M. DUBOW² et M. LE-BRUN¹

¹ Institut de Génétique et de Microbiologie (IGM) – UMR8621 – Université Paris Sud 11 – AgroParisTech – 91405 Orsay cedex ; ² EDF R&D, Département LNHE, 6, quai Watier, 78400 Chatou ; ³ Ajilon Engineering, Energie - Environnement, 88 ter, avenue du Général Leclerc 92100 Boulogne Billancourt
delphine.jakubek@edf.fr

Les circuits de refroidissement semi-fermés des centrales nucléaires, favorisent par leur mode de fonctionnement la prolifération d'organismes thermophiles. Parmi ces micro-organismes figure l'espèce *Legionella pneumophila*, bactérie pathogène pour l'homme et responsable de plus de 98% des cas de légionellose en France. Afin de limiter les risques associés à la présence de ce pathogène dans les circuits de refroidissement, des seuils de concentration en légionelles à ne pas dépasser ont été fixés et des mesures correctives et préventives ont été déterminées (chloration massive, traitement à la monochloramine en séquentiel ou en continu). Le traitement de désinfection de l'eau des circuits de refroidissement à la monochloramine a montré par retour d'expérience son efficacité biocide contre les légionelles. Cependant, les modalités d'utilisation du traitement, à des concentrations basses (0.25 ppm) et sur le long terme entraîne une interrogation sur l'efficacité au long terme du traitement à la monochloramine.

Un protocole de détermination de la sensibilité des légionelles à la monochloramine par la mesure *in vitro* de leur Ct_{99,9%} a été développé et validé. Le Ct_{99,9%} correspond au produit de la concentration en monochloramine appliqué lors du test *in vitro* par le temps de contact nécessaire pour abattre 99.9% des légionelles. Les valeurs des Ct_{99,9%} mesurées *in vitro* peuvent varier en fonction des conditions expérimentales et l'efficacité du biocide est dépendante des facteurs température et pH. La détermination expérimentale des paramètres optimaux de concentration en monochloramine, pH, température et concentration en

légionelles permettant de répondre à 2 critères de validation de la méthode a été réalisée à l'aide d'un plan d'expérience complet. Le plan d'expérience complet permet de réduire le nombre total d'expériences à réaliser et de mesurer le poids associé à chacune des variables ainsi qu'à leurs interactions sur les critères de validation de l'expérience.

Cette étude a permis de déterminer les conditions expérimentales optimales pour observer un abattement de 99.9% des légionelles en 30 minutes et influencer au minimum l'efficacité de la monochloramine. Cette étude a également montré l'influence différente mais de poids équivalent des 4 paramètres sur le temps nécessaire pour abattre 99.9% des légionelles et les effets antagonistes du pH et de la température sur l'efficacité de la monochloramine.

Ce protocole est utilisé pour mesurer *in vitro* et comparer la sensibilité à la monochloramine de souches bactériennes non *Legionella*, *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* isolées des circuits de refroidissement dans différentes conditions de traitement à la monochloramine.

Croissance sessile de *L. pneumophila* et formation de biofilms.



S. PÉCASTAINGS

S. PÉCASTAINGS¹, M. BERGÉ, K.M. DUBOURG et C. ROQUES

¹ Université Paul Sabatier, Laboratoire de Génie Chimique, Université Paul Sabatier
Laboratoire de Génie Chimique, département BioSym, UMR 5503, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des Maraîchers, 31062
Toulouse cedex 09
sophie@pecastaings.net

La présence de légionelles dans un réseau d'eau va souvent de pair avec le développement de biofilms sur les parois des canalisations. Pourtant, à l'heure actuelle, la colonisation de surfaces par *Legionella pneumophila* et sa capacité à former des biofilms sont encore mal comprises. En milieu oligotrophe, *L. pneumophila* n'est capable que de coloniser des biofilms déjà formés et sa réplication est dépendante de la présence de protozoaires dans lesquels la bactérie peut se multiplier.

En milieu riche, *L. pneumophila* forme des biofilms mono-espèces, mais la multiplication bactérienne se produit de manière planctonique et le biofilm observé résulte du dépôt des bactéries planctoniques.

Des études plus ou moins récentes apportent cependant des arguments en faveur d'une possible multiplication extracellulaire (croissance nécotrophique ou en association avec des cyanobactéries) et en l'occurrence au sein de biofilms.

Le but de cette étude était de rechercher des conditions permettant la multiplication extracellulaire de *L. pneumophila* aboutissant à la formation de biofilms mono-espèce.

Le protocole expérimental consiste à inoculer *L. pneumophila* dans les puits de microplaques 24-puits contenant les milieux de culture testés. L'élimination des bactéries planctoniques est assuré par des renouvellements de milieux tous les trois jours. Les bactéries adhérentes ou planctoniques sont quantifiées par culture sur boîte ou PCR quantitative. Dans un second temps, la microscopie confocale par balayage laser a

été utilisée pour déterminer la structure tridimensionnelle des biofilms formés.

Parmi 9 milieux de culture testés, un milieu contenant des éléments minéraux et de concentration réduite en carbone par rapport au milieu riche (Buffered Yeast Extract, BYE) a été sélectionné (BBS). Des biofilms constitués de $5,75 \pm 0,12 \log \text{ CFU/cm}^2$ ont été observés après 12 jours d'incubation à 37 °C. L'absence de multiplication des bactéries planctoniques a été validée dans ce milieu. Ces essais ont également montré que la température optimale de développement du biofilm est de 37 °C.

Les observations *in situ* par microscopie confocale ont révélé une structure typique d'un biofilm : des amas de cellules atteignant 300 µm ont été observés dès 6 jours d'incubation. Cette structuration révèle une différence importante par rapport à des biofilms formés en BYE (amas de 20 µm). Le marquage de certains carbohydrates par la concanavaline, une lectine, couplée à un fluorophore indique la présence d'une matrice polysaccharidique au sein de ce biofilm.

Le modèle de formation de biofilm à *L. pneumophila* décrit dans cette étude constitue un protocole innovant, permettant notamment une structuration différente par rapport au milieu riche. Cette méthode pourra servir de base à des études de facteurs influençant la formation du biofilm ou bien la sélection de biocides.

Effet des changements de température de l'eau sur la présence de *L. pneumophila* dans un biofilm : étude expérimentale.



C. MAURICE-BLANC

C. MAURICE-BLANC¹, S. VIBOUD¹, A. TOURON-BODILIS² et D. FONTVIEILLE¹

¹ Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et les Ecosystèmes Limniques, Université de Savoie 73376 Le Bourget du Lac ; ² EDF R&D, Laboratoire National d'Hydraulique et d'Environnement 6 Quai Watier 78401 CHATOU
cecile.maurice-blanc@univ-savoie.fr

La contamination des eaux chaudes des sources thermales d'Aix-les-Bains par la bactérie *L. pneumophila* a conduit à l'arrêt de leur exploitation et à leur substitution par des forages puisant l'eau dans une zone plus profonde, en amont de toute contamination. Les eaux des sources, potentiellement chargées en fragments de biofilms, continuent cependant à se déverser de manière naturelle dans l'un des affluents du Lac du Bourget. Ce changement de milieu représente un choc thermique pour la population bactérienne des fragments de biofilms. Le but de cette étude était d'évaluer l'impact de ce choc thermique sur les caractéristiques des populations microbiennes fixées et plus particulièrement sur *L. pneumophila*.

Cette étude expérimentale a fait appel à des réacteurs biologiques dans lesquels des biofilms à légionelles issus des sources thermales ont été soumis à différentes températures. Tous les réacteurs étaient alimentés par l'eau de la rivière, directement dans le cas des réacteurs témoins et après chauffage dans le cas des réacteurs essais. Les biofilms ont été prélevés à des pas de temps variables pendant toute la durée de l'expérience (20 jours). L'expérience a été répétée 3 fois avec des différences de température (ΔT) de 4°C, 8°C et 12°C, qui représentaient respectivement une augmentation de la température de la rivière de 32, 51 et 77%.

Les résultats ont montré que l'augmentation de la température n'a pas d'effet significatif sur la concentration de l'ensemble des bactéries du biofilm, ni sur sa fraction cultivable. A l'inverse, parmi les températures testées, même les plus basses permettent au moins le maintien de *L. pneumophila* dans les biofilms. Une

augmentation de la proportion de *L. pneumophila* «total» (dénombrement par immunofluorescence) est observée en correspondance avec la plus forte valeur de ΔT (+12°C). La forme cultivable de *L. pneumophila* est encore plus sensible à l'augmentation de température car elle augmente significativement, en proportion, à partir de $\Delta T = 8^\circ\text{C}$. Pour $\Delta T = 12^\circ\text{C}$, la proportion de *L. pneumophila* cultivables atteint 100% de l'ensemble des *L. pneumophila*.

Ainsi, lorsque des fragments sont apportés dans le cours d'eau récepteur par les eaux thermales, les cellules de *L. pneumophila* présentes dans ces fragments ne seront pas éliminées par le seul effet du refroidissement que représente la différence de température entre l'eau thermale et le cours d'eau récepteur. Nos résultats montrent même qu'en fonction de la température de l'eau et donc de la saison, elles peuvent se multiplier dans le milieu récepteur.

Comparative genomics and evolution of virulence of *L. pneumophila* and *L. longbeachae*.



C. BUCHRIESER

Carmen BUCHRIESER

Institut Pasteur, Biologie des Bactéries Intracellulaires and CNRS URA 2171, Paris, France

Among the 53 *Legionella* species described to date, *Legionella pneumophila* and *Legionella longbeachae* are the most abundant ones isolated from Legionnaire's disease cases. Furthermore, *L. pneumophila* serogroup 1 is responsible for most of the legionellosis cases worldwide and some pandemic clones like *L. pneumophila* strain Paris have been identified. We have used comparative genomics of *L. pneumophila* and *L. longbeachae* and of 8 isolates of strain Paris from different countries and years to get insight in the evolution of virulence of *Legionella* and the evolution of this particular clone. Replication within protozoa is essential for the survival of *Legionella*. Analysis of the genome sequences of *L. pneumophila* and *L. longbeachae* revealed the presence of an unexpected high number and variety of eukaryotic-like proteins, predicted to be involved in the exploitation of the host cellular cycle by mimicking specific eukaryotic functions. Phylogenetic analyses demonstrated that both lateral gene transfer from eukaryotic hosts and bacterial genes that became eukaryotic-like by convergent evolution, contributed to the evolution of these proteins within *Legionella*.

Genomics and population structure in *Legionella pneumophila*.



M. COSCOLLA

Mireia COSCOLLÀ, Iñaki COMAS et Fernando GONZÁLEZ CANDELAS

Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva. Universitat de València, Valencia, Spain, 46070

Homologous recombination and horizontal gene transfer are recognized as powerful sources of evolutionary innovation and accelerators of adaptive responses in many bacteria. Most analyses of these processes in bacterial pathogens have centered on particular loci or groups of genes involved in pathogenicity, antibiotic resistance, or host-range determination. Here we present an integral evaluation of the extent and relevance of these processes in *Legionella pneumophila*.

First, we have evaluated the extent of recombination at the population level by analyzing the nucleotide sequence at 9 loci from a sample of 100 clinical and environmental *L. pneumophila* isolates from the Comunidad Valenciana (Spain). About 25% of the total nucleotide diversity found in this sample can be attributed to recombination. Second, by comparing the 4 complete genome sequences of *L. pneumophila*, we have estimated around 300 genome-wide recombination events along the genome, which are not distributed uniformly since some "hot spot" regions for recombination have been identified. We have also found a positive correlation between recombination events and genetic diversity. Finally, the phylogenomic analysis of this same data set has been used to evaluate the extent of horizontal gene transfer from non-*Legionella* genomes as well as the patterns of gene gains and losses in the four different lineages. The results obtained allow us to propose a model for the frequency of transfers and their detection under different ecological and analytical conditions.

The results reported here further reinforce the relevance of non-vertical transmission events in the short-term evolution of this species and also in shaping their genome content at large evolutionary timescales.

Les systèmes CRISPR/cas chez *Legionella pneumophila*.



C. GINEVRA

Christophe GINEVRA^{1,2}, **Nathalie JACOTIN**^{1,3}, **Laure DIANCOURT**⁴, **Ghislaine GUIGON**⁴, **Romain ARQUILLIERE**¹, **Hélène MEUGNIER**³, **Ghislaine DESCOURS**¹⁻³, **François VANDENESCH**¹⁻³, **Jerome ETIENNE**¹⁻³, **Gérard LINA**¹⁻³, **Valérie CARO**⁴ et **Sophie JARRAUD**¹⁻³

¹ Université de Lyon, Centre National de Référence des légionelles, Lyon

² INSERM U851, Lyon

³ Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁴ Institut Pasteur, Genotyping of Pathogens and Public Health, Paris, France

Legionella pneumophila est l'agent causal de la légionellose. Cette bactérie est omniprésente dans les milieux aqueux dans lequel elle doit être en contact avec de nombreux phages. Les systèmes CRISPR/cas correspondent au système immunitaire adaptatif des bactéries contre les phages. Ces systèmes CRISPR/cas se caractérisent par une succession de séquences répétées directes de 30 à 40 pb (DR) séparées par des espaceurs (séquences uniques, de taille similaire aux DR mais variables). A partir des génomes de *Legionella* disponibles, 2 systèmes CRISPR/cas ont été détectés. Les souches Lens et Alcoy possèdent un CRISPR (la souche Lens en compte un sur son chromosome et un sur le plasmide pLPL), les souches Paris et 130b possèdent un CRISPR différent (avec une autre DR), les autres souches séquencées ne possèdent pas de systèmes CRISPR/cas. Pour étudier la diversité des systèmes CRISPR/cas chez *L. pneumophila*, les loci CRISPR de 2 groupes de souches de *L. pneumophila* ont été séquencés : le premier est composé de 7 souches sporadiques toutes porteuses du plasmide pLPL, le second est composé de 28 isolats de la souche endémique Paris et de 5 souches sporadiques positive pour le même CRISPR. L'analyse des génomes, le séquençage de 40 loci CRISPR a permis l'identification de 394 espaceurs différents. Pour les 2 différents loci CRISPR, les souches proches phylogénétiquement ne diffèrent que par des délétions de DR et d'espaceurs. Les souches plus éloignées phylogénétiquement ont un contenu en espaceurs différent. La comparaison de

la séquence de ces espaceurs aux bases de données n'a permis l'identification d'aucune séquence d'origine phagique, une homologie de séquence n'a été mise en évidence que pour 8 d'entre eux, tous homologues à des séquences de *Legionella*.

Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes



L. GOMEZ-VALERO

L GOMEZ-VALERO¹, **C. RUSNIOK**¹, **S. JARRAUD**^{2,3,4}, **B. VACHERIE**⁵, **Z. ROUY**^{5,6}, **V. BARBE**⁵, **C. MEDUIGE**^{5,6}, **J. ETIENNE**^{2,3,4} et **C BUCHRIESER**^{1*}

¹ Institut Pasteur, Biologie des Bactéries Intracellulaires and CNRS URA 2171, 75724 Paris, ² Université de Lyon, France, Centre National de Référence des Legionella, ³ INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France, ⁴ Hospices Civils de Lyon, France, ⁵ CEA /DSV/FAR/IG/Genoscope Laboratoire de Génomique Comparative, and ⁶ CNRS UMR8030 Laboratoire d'Analyses Bioinformatiques en Métabolisme et Génomique, 2 rue Gaston Cremieux 91057 Evry Cedex, France
lgomez@pasteur.fr

Legionella pneumophila is a Gram-negative, intracellular, bacterial pathogen, causing respiratory infections known as Legionnaires' disease and Pontiac fever. Analysis of four *L. pneumophila* genomes (strains Paris, Lens, Philadelphia and Corby) had revealed as main features of this species: high genetic diversity, marked plasticity and the presence of many eukaryotic-like proteins many of which have now been shown to interfere in different steps of the infectious cycle by mimicking functions of host proteins. In order to identify additional factors probably involved in human disease and in host pathogen interactions, we determined the sequence of two new strains of *L. pneumophila*: Lorraine, an emerging strain causing community acquired Legionnaires' disease in France, England, Wales, Netherlands and Greece and a "non-pathogenic" *L. pneumophila* strain (HLO6041035) isolated over many years from the water system of a French hospital, without causing disease. Interestingly, the Lorraine strain is a significant cause of Legionnaires disease in France and England but is rarely isolated from the environment. Here we present the results of the genomic comparison of these six different *L. pneumophila* strains with the aim to determine the common *L. pneumophila* core and the specific traits associated to each strain and to their associated virulence properties.

Our results show that *L. pneumophila* Sg1 has a highly conserved and syntenic core genome that comprises the many eukaryotic like proteins and a conserved repertoire of over 200 Dot/Icm type IV secreted sub-

strates. However, recombination events and horizontal gene transfer are also frequent. The many secretion systems present might be implicated in exchange of these fragments by conjugal transfer. Plasmids also play a role in genome diversification and are exchanged among strains and circulate between different *Legionella* species.

In conclusion this study shows that horizontal gene transfer among bacteria and from eukaryotes to *L. pneumophila* as well as recombination between strains allows different clones to evolve into predominant disease clones and others to replace them subsequently within relatively short periods of time

Amoebae-resisting micro-organisms: focus on *Chlamydia*-related bacteria.



G. GREUB

© CEMCAV_CHUV_P.Duhot

Gilbert GREUB

Lausanne, Switzerland

Free-living amoebae represent a widespread reservoir for a variety of amoebal symbionts and amoebal pathogens, including *Legionella*, *Mycobacteria* and *Chlamydia*-related bacteria. Amoebae also plays the role of an evolutionary crib, where genes are exchanged between the various amoebae-resisting bacteria and where virulence traits allowing resistance to other phagocytic cells such as macrophages may be selected. This likely explain the various strategies developed by *Chlamydiae* to survive to the microbicidal machinery of macrophages. Finally, amoebae may be used as a powerful culture system to recover new strict intracellular bacteria from heavily contaminated environment, which pathogenic role may then be assessed. Thus, new *Chlamydia*-related bacteria such as *Estrella lausannensis* and *Criblamydia sequanensis* were recovered using amoebal co-culture. Although the knowledge on *Chlamydia*-related bacteria is still limited, several species have been recognized as emerging human pathogens including *Parachlamydia acanthamoebae* (lung infections) and *Waddlia chondrophila* (miscarriage).

Rôle du di-GMPc dans le contrôle des étapes précoces de l'infection de *L. pneumophila*.



A. VIANNEY

J. ALLOMBERT, M. LEVET-PAULO, J-C. LAZZARONI, N. BAÏLO, P. DOUBLET et A. VIANNEY

Unité de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (UMR5240) Université Claude Bernard Lyon1 – bât. Lwoff 10, rue Dubois - 69622 Villeurbanne Cedex
anne.vianney@univ-lyon1.fr

Le di-GMPc est un second messager spécifique des bactéries, qui participe au contrôle de fonctions clés telles que la mobilité, la formation de biofilms et la virulence (Hengge, 2009). Il est synthétisé à partir de deux molécules de GTP par des enzymes spécifiques, les diguanylate cyclases (DGC), caractérisées par un motif protéique GGDEF. Sa dégradation est prise en charge par des phosphodiesterases (PDE) spécifiques, à motif EAL. L'abondance des protéines «GGDEF/EAL» chez certaines bactéries (ex : 63 chez *Vibrio cholerae*) suggère l'existence d'un réseau complexe de coordination de leurs activités en fonction des signaux captés.

Le cycle infectieux de *Legionella pneumophila* repose sur l'alternance entre une phase de répllication intracellulaire dans des cellules hôtes (amibes, macrophages alvéolaires...) et une phase de transmission d'une cellule hôte à l'autre. L'analyse de trois génomes de *L. pneumophila* a révélé une vingtaine de gènes codant pour des protéines à motif GGDEF et/ou EAL. Ces gènes sont pour la plupart 2 à 10 fois plus exprimés en phase de transmission associée à l'émergence des traits de virulence (Brüggeman et al., 2006). Ceci suggère un mécanisme de régulation de certains traits de virulence sous le contrôle de ces protéines, comme c'est le cas chez *V. cholerae*.

Afin d'identifier les protéines à domaines GGDEF/EAL impliquées dans le contrôle de la virulence de *L. pneumophila*, l'invalidation de chacun des gènes codant une des 22 protéines GGDEF/EAL a été réalisée dans la souche épidémique Lens. L'efficacité d'infection vis-à-vis des cellules hôtes des souches obtenues a été testée. De plus, afin de valider le lien entre le défaut de virulence observé, et la délétion introduite dans ces

souches, des plasmides permettant des expériences de complémentation ont été construits. Ces plasmides portent, soit les gènes sauvages correspondants, soit ces gènes contenant une mutation introduisant une substitution sur le motif catalytique conservé de la protéine (GGDEF ou EAL). Enfin, différents tests ont été réalisés avec les souches déficientes pour la virulence pour évaluer l'efficacité de certaines étapes clés du cycle infectieux : cytotoxicité de contact, survie précoce, formation de la vacuole de répllication spécifique de *L. pneumophila*... Nous avons pu ainsi établir que 3 protéines à domaines GGDEF et/ou EAL interviennent dans le contrôle des étapes précoces de l'infection, et que l'une d'elle est requise pour le recrutement du réticulum endoplasmique autour de la vacuole de répllication.

Par ailleurs, l'analyse des activités biochimiques des protéines GGDEF/EAL de *L. pneumophila* nous a conduit à décrire un système à deux composants original comprenant la protéine à double activité enzymatique DGC-PDE Lpl0329, et la protéine histidine kinase (HK) Lpl0330. L'HK Lpl0330 est capable de s'autophosphoryler et de transférer son phosphate à Lpl0329. L'identification du site d'autophosphorylation de Lpl0330 a permis de mettre en évidence un nouveau domaine HisKA contenant un motif nommé « HGN », retrouvé dans 64 autres HK potentielles appartenant à des espèces bactériennes variées. De plus, la phosphorylation de Lpl0329 modifie l'équilibre entre ses deux activités enzymatiques en diminuant l'activité DGC seulement. Ainsi, Lpl0329 est le premier régulateur de réponse à double activité enzymatique caractérisé, dont la phosphorylation conduit à moduler le taux de di-GMPc en favorisant une de ses deux activités.

Nucleoid-associated proteins control stress adaptation and virulence traits in *Legionella pneumophila*.



E. KAY

M. VERGNES¹, T. SAHR², S. JARRAUD³, C. BUCHRIESER², D. SCHNEIDER¹ et E. KAY¹

¹Adaptation et Pathogénie des Micro-Organismes, Université Joseph Fourier and CNRS UMR5163, Grenoble, ²Biologie des Bactéries Intracellulaires, Institut Pasteur and CNRS URA 2171, Paris, ³Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine Laënnec, Université Lyon 1 and INSERM U851, Lyon, France

To adapt to harsh conditions and alternation between intra- and extracellular environments, *Legionella pneumophila* has intricate signaling networks that sense the environment and adjust cellular physiology accordingly. Nucleoid-associated proteins (NAPs) play important roles in this adaptive process as they adjust global gene transcription in response to environmental cues. Most NAPs possess DNA-binding activity and an ability to alter DNA topology locally, thereby modifying nucleoid organisation and gene transcription regulation in Gram-negative bacteria. Here, we showed that *L. pneumophila* mutants deficient for one and/or the other subunit of the IHF protein are impaired in their viability and cultivability in late stationary phase as well as in their intracellular replication in amoebae and human macrophages. To provide mechanistic insights for these phenotypic changes, we compared the global transcription profiles of an IHF-deficient mutant and its reference strain. Our analyses revealed approximately 200 genes that are regulated by IHF, including the three global regulator-encoding genes *rpoS*, *csrA* and *rsmZ*, that govern the expression of main virulence traits, and the flagellar class II genes involved in the biosynthesis of the flagellum basal body and hook. Then, we identified consensus IHF-binding sites in the promoter regions of *csrA*, *rpoS*, *flgB* and *rsmZ* and demonstrated direct binding of purified IHF on these regions by EMSA.

Finally, our results support a model in which IHF would coordinate the adaptation to nutritional stress and expression of virulence traits. In particular, IHF would be a key intermediate in the complex regulatory cascade that coordinates the transition between the replicative

and transmissive (or virulent) phases in *L. pneumophila*.

Legionella interaction sites in the alveoli.



M. STEINERT

M. STEINERT¹, C. ÜNAL¹, O. SHEVCHUK¹, J. JÄGER¹, F. FRESE¹, J. TIEFENAU¹ and J. RASCH¹

¹Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Spielmannstr. 7, D-38106 Braunschweig

During human infection *Legionella pneumophila* is confronted with several interaction sites of the alveoli. These interaction sites are (i) the blood-air barrier including epithelial cells, basement membrane and capillary endothelial cells, (ii) the innate immune system including macrophages, polymorphonuclear neutrophils (PMNs), dendritic cells, and (iii) the adaptive immunity. We established several infection models to analyse different aspects of the intra- and extracellular pathogenicity of *L. pneumophila*. By using lung epithelial cells and a newly established purification protocol for outer membrane vesicles (OMVs) of *L. pneumophila*, we were able to analyze destructive enzyme activities of OMVs, alterations of induced cytokine profiles, host cell killing and binding of OMVs to alveolar epithelial cells. By utilising human macrophages, PMNs and the model organism *Dictyostelium discoideum* we were able to functionally analyse infection relevant host cell factors, including calnexin, actin, coronin, Nramp and the autophagy protein ATG9. Investigations with an artificial basement membrane model revealed that the *Legionella* virulence factor Mip (macrophage infectivity potentiator) binds specifically to a surface-exposed 13-mer peptide sequence in the NC1 domain of collagen IV and contributes to bacterial adhesion and dissemination within infected lung tissue. Based on NMR data and docking studies a model for the mode of interaction of Mip and collagen IV was developed.

Lcl of *Legionella pneumophila* is an immunogenic GAG binding adhesin that promotes interactions with lung epithelial cells and plays a crucial role in biofilm formation.



C. GUYARD

Cyril GUYARD

Public Health Ontario, University Of Toronto

Legionellosis is mostly caused by *Legionella pneumophila* and is defined by a severe respiratory illness with a case fatality rate ranging from 10 to 50%. *In vitro* and *in vivo*, interactions of *L. pneumophila* with lung epithelial cells are mediated by the sulphated glycosaminoglycans (GAG) of the host extra-cellular matrix. In this study, we have identified several *Legionella* heparin binding proteins. We have shown that one of these proteins, designated Lcl, is a polymorphic adhesin of *L. pneumophila* that is produced during legionellosis. Homologues of the Lcl are ubiquitous in *L. pneumophila* serogroups but are undetected in other species. Recombinant Lcl binds to GAGs and a Δ lpg2644 mutant demonstrated reduced binding to GAGs and human lung epithelial cells. Importantly, we showed that the Δ lpg2644 strain is dramatically impaired in biofilm formation. These data delineate the role of Lcl in the GAG binding properties of *L. pneumophila* and provide molecular evidence regarding its role in *L. pneumophila* adherence and biofilm formation.

La protéine kinase LegK2, un effecteur du SST4 de *Legionella pneumophila* impliqué dans le recrutement du réticulum endoplasmique et dans la réplication intracellulaire.



P. DOUBLET

E. HERVET, E. CHADEAU, N. BAILO, D. SPERANDIO et P. DOUBLET

Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR5240 CNRS-Université Lyon1, Bat A. Lwoff, 10 rue Dubois, Campus de la Doua, 69622 Villeurbanne, France

Les souches pathogènes de *Legionella pneumophila* émergent de notre environnement après multiplication dans des amibes, sont disséminées par la technologie humaine, puis infectent les macrophages alvéolaires humains. Les cycles infectieux de *L. pneumophila* dans les amibes et les macrophages sont très similaires : après phagocytose, la vacuole contenant les légionelles échappe à la voie endosomale, recrute des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique, et devient ainsi une niche répliquative dans laquelle les bactéries se multiplient activement. Le Système de Sécrétion de Type 4 Dot/Icm, qui transloque plus de 200 protéines effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte, est essentiel à *L. pneumophila* pour effectuer efficacement ce cycle. Aussi, identifier la contribution de chacun de ces effecteurs dans le cycle infectieux de *L. pneumophila* reste à ce jour un objectif majeur, voire l'objectif principal, pour comprendre les bases moléculaires de la virulence des légionelles.

Notre étude vise à répondre à cette question en caractérisant le rôle de l'une de ces familles d'effecteurs, les protéines kinases (PKs), dans la virulence des légionelles. L'analyse *in silico* et des tests de phosphorylation *in vitro* ont permis d'identifier 5 protéines kinases fonctionnelles, LegK1-LegK5, codées par le génome de la souche épidémique *L. pneumophila* Lens. Des tests de translocation ont montré qu'à l'exception de LegK5, les protéines kinases de *Legionella* sont transloquées dans la cellule hôte de façon Dot/Icm dépendante. L'inactivation de chacun des gènes *legK* a mis en évidence le rôle majeur de LegK2 dans la virulence de *L. pneumophila*. Le mutant *legK2* présente en effet un défaut de recrutement du réticulum endoplasmique qui entraîne un retard de la réplication

intracellulaire. Un mutant de substitution, déficient pour l'activité kinase de LegK2, présente les mêmes défauts de virulence, ce qui démontre le rôle central de la phosphorylation dans le contrôle de ce processus. Les mécanismes moléculaires contrôlés dans la cellule hôte par LegK2 ont été explorés par deux approches complémentaires: la recherche d'interactants de LegK2 par un crible double hybride dans la levure, et la recherche de substrats de LegK2 par des tests de phosphorylation *in vitro* sur puce à protéines. Après validation des protéines candidates ainsi identifiées, le rôle effectif de chacune d'entre elles dans le cycle infectieux de *L. pneumophila* sera établi.

Développement d'une méthode rapide pour la quantification de *Legionella* spp dans les eaux environnementales en 48 heures par la méthode FISH-ScanRDI™.

P1

M. BINET^{1*}, **J. BAUDART**^{2,3}, **A. MERCIER**^{2,3}, **A. TOURON-BODILIS**¹, **C. GUILLAUME**⁴, **P. LEBARON**^{2,3}

¹ EDF, Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement, 6 quai Watier, F-78401, Chatou cedex, France

² UPMC Univ Paris 06, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/mer, France

³ CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/mer, France

⁴ Ajilon Engineering, Energie-Environnement, 88ter avenue du Général LECLERC 92100 Boulogne Billancourt

* marie.binet@edf.fr

La légionellose est une maladie respiratoire qui se manifeste sous deux formes cliniques : la maladie du légionnaire et la fièvre de Pontiac. Elle est provoquée par inhalation de micro-gouttelettes d'eau contaminée par les bactéries du genre *Legionella*. Ces bactéries, présentes à faibles concentrations dans les milieux aquatiques naturels ou artificiels, peuvent proliférer dans certaines conditions notamment dans les circuits d'eau chaude sanitaire et les circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes.

La surveillance environnementale des *Legionella* est encadrée par la réglementation qui repose actuellement sur l'utilisation de la méthode par culture sur milieu sélectif, pour l'identification et la quantification des légionelles (norme NF T90-431). Cette méthode présente l'inconvénient majeur de fournir un résultat fiable en 10 à 12 jours.

Pour accroître la réactivité en cas de contamination des systèmes de refroidissement par des légionelles, une méthode rapide et quantitative a été développée : FISH ScanRDI™. Le dénombrement spécifique d'un échantillon d'eau brute est réalisé après culture sur filtre et hybridation fluorescente *in situ*. Les microcolonies de légionelles marquées sont dénombrées par un cytomètre en phase solide (AES-Chemunex). Cet appareil possède une limite de détection très basse en comparaison à d'autre détecteur de fluorescence.

La méthode a été développée et optimisée pour répondre à 4 critères :

- applicabilité dans des eaux de forte complexité,

- rapidité d'obtention d'un résultat fiable (24 à 48 heures),
- détection des évolutions de concentrations en légionelles dans les circuits,
- Quantification équivalente à la norme AFNOR pour permettre un suivi et une gestion des circuits en référence aux seuils réglementaires fondés sur la méthode culturale.

La méthode FISH-ScanRDI™ est spécifique de *Legionella* spp, fidèle, linéaire (sur une gamme de 2.10^2 à 2.10^7 Lspp/L) et présente une limite de détection basse (2.10^2 Lspp/L) compatible avec les seuils réglementaires.

L'efficacité de la méthode a été comparée à la méthode de référence sur des eaux de complexité variable (eau chaude sanitaire, eau décarbonatée, eau de pilote de circuit de refroidissement, eau de circuit de refroidissement alimenté en eau environnementale, eaux traitée par biocide) et au cours d'un monitoring de 4 circuits pendant 5 mois (n=172). La méthode *Legionella* FISH-ScanRDI™ permet d'obtenir d'un résultat présentant un faible écart à la norme ($\leq 0,5$ log pour 88% des échantillons) en réduisant significativement son délai d'obtention. La méthode peut être très utile comme outil de suivi des colonisations en légionelles des systèmes d'eau complexes.

Validation de l'IRS PCR, une méthode de typage moléculaire, par intercomparaison avec les méthodes de référence, SBT et PFGE, pour l'étude de la diversité et de la dynamique des légionelles dans les circuits de refroidissement.

P2

D. JAKUBEK^{1,2}, M. LE-BRUN¹, G. LEBLON², M. DUBOW² et M. BINET¹

¹ Institut de Génétique et de Microbiologie (IGM) – UMR8621 – Université Paris Sud 11 – AgroParisTech – 91405 Orsay cedex

² EDF R&D, Département LNHE, 6, quai Watier, 78400 Chatou
delphine.jakubek@edf.fr

Les circuits de refroidissement semi-fermés des centrales nucléaires, favorisent par leur mode de fonctionnement la prolifération d'organismes thermophiles. Parmi ces micro-organismes figure l'espèce *Legionella pneumophila*, bactérie pathogène pour l'homme et responsable de plus de 98% des cas de légionellose en France.

Pour évaluer le risque microbiologique associé à la présence de ce pathogène dans les circuits de refroidissement, il est essentiel d'améliorer les connaissances sur l'écologie des légionelles dans les circuits.

L'objectif de cette étude est de valider une méthode de typage moléculaire des légionelles appelée Infrequent Restriction Site Polymerase Chain Reaction (IRS PCR) adaptée à l'étude de l'écologie des légionelles à grande échelle et de comparer cette méthode avec les méthodes de référence, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) et Sequence Based Typing (SBT).

L'IRS PCR est une méthode de typage moléculaire basée sur le polymorphisme de 2 sites de restriction. La validation de cette méthode a été réalisée par le typage de 45 souches de *Legionella pneumophila* isolées de manière indépendante des circuits de refroidissement. Ces 45 souches ont été identifiées par 3 méthodes différentes : l'IRS PCR, la PFGE et la SBT. Les caractéristiques de chacune des méthodes ont été mesurées et comparées pour évaluer l'efficacité de l'IRS PCR.

Les résultats de cette étude montrent que l'IRS PCR possède un pouvoir discriminant similaire voire supérieur aux méthodes de référence. La reproductibilité de l'IRS PCR est légèrement inférieure à la PFGE et à

la SBT, mais reste acceptable (>95%) en sachant que l'identification par IRS PCR combine l'analyse automatique des profils électrophorétiques et la vérification visuelle de l'identification proposée.

L'IRS PCR, par sa rapidité (2 jours après la culture) et son faible coût, est donc un outil approprié pour l'étude de l'écologie des légionelles à grande échelle dans les circuits de refroidissement.

1 : Riffart, S., et al., Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol, 1998, 36(1): p. 161-167.

Developpement d'un profil DGGE pour l'identification de la diversité de légionelles dans les eaux.

P3

S. BAYLE¹, A. CADIERE², S. JARRAUD³, L. GARRELLY⁴ et B. ROIG^{2*}

¹ Centre LGEI Environnement Industriel Ecole des Mines d'Alès, 6 avenue de Clavières, Alès - France ; ² École des Hautes Études en Santé Publique, Laboratoire d'Étude et de Recherche en Environnement et Santé (LERES); 35043 Rennes (France) ;

³ Université de Lyon, France, Centre National de Référence des Legionella ; INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France ; Hospices Civils de Lyon, France ; ⁴ GL Biocontrol, Mas Bas cedex 1040 Aspères 30250
*benoit.roig@ehesp.fr

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires dans les milieux aqueux naturels ou artificiels. Elles causent des infections des voies pulmonaires qui surviennent principalement par inhalation d'aérosols générés à partir des sources d'eau, comme les systèmes de distribution et de tours de refroidissement.

Plusieurs études ont montré la diversité des souches de Legionelle dont certaines inconnues et non cultivables, dans divers échantillons environnementaux (eau de loisirs, piscine, douches, eaux, sols). Parmi les nombreuses espèces de *Legionella* décrites (57 espèces identifiées), *L. pneumophila* est associé à 90 % des maladies humaines dans le monde. Vingt autres souches ont été décrites à l'origine de pathologies humaines.

Le contrôle de la qualité des eaux s'effectue par la quantification des légionelles spp. Selon la concentration mesurée, la réglementation européenne a défini différents niveaux d'action. La désinfection des circuits d'eaux par des produits toxiques (biocide chlorés, bromés) est généralement utilisée pour des actions curatives. Bien qu'efficace sur la réduction de *Legionella* spp, ce type d'action peut conduire à une sélection des souches les plus résistantes.

Compte tenu de la diversité des populations de légionelles dans les environnements aqueux, le dénombrement des *Legionella* spp ne représente pas à lui seul, le risque réel de contamination des populations.

Une approche plus globale, intégrant la diversité bactérienne dans le réseau et son évolution spatio-temporelle permettrait de prendre des mesures plus

appropriées et pertinentes de protection, de décontamination, ou de prévention. En particulier, des données sur la pathogénicité des espèces présentes apporteraient une valeur ajoutée au diagnostic actuellement réalisé.

Dans ce contexte, nous proposons une méthode de caractérisation des populations de légionelles en complément des méthodes de quantification par qPCR ou culture. Plus précisément, nous avons développé un profil de référence DGGE de 18 espèces permettant d'identifier en partie la diversité légionelle. En pratique, il s'agit de comparer la migration électrophorétique sur gel dénaturant d'un extrait d'ADN amplifié avec le profil de référence et d'en déduire la présence et la nature de la flore bactérienne.

Cette méthode apporte des informations complémentaires, notamment en terme de pathogénicité, nécessaires à une gestion efficace des mesures à prendre en cas de dépassement des seuils réglementaires.

Effet de la température et de la MOI sur la prolifération de *Legionella pneumophila* dans différentes souches amibiennes.

P4

M. DUPUY^{ab}, S. SOREAU^a, P. HERBELIN^a, C. BOUTELEUX^a, M. BINET^a, F. BERNE^b et Y. HÉCHARD^b

^a EDF, R&D, Département LNHE, 6 quai Watier, 78 401 Chatou cedex

^b Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 6008, Université de Poitiers
mathieu.dupuy@univ-poitiers.fr

Les légionelles sont des bactéries pathogènes, ubiquitaires des environnements aqueux naturels (rivières, lacs) et artificiels (réseaux d'eau, tours aéro-réfrigérantes, réservoirs...). Les amibes libres sont présentes dans les mêmes niches écologiques et peuvent servir de réservoir pour *Legionella pneumophila*. Cette association permet une multiplication et une augmentation de la virulence de *L. pneumophila*. Il apparaît donc important d'étudier les paramètres susceptibles d'influencer la multiplication intra-amibienne de *L. pneumophila* et de connaître les genres amibiens les plus enclins à favoriser sa prolifération. Lors de cette étude, la capacité de plusieurs souches d'amibes à multiplier les légionelles a été évaluée. Une douzaine de souches amibiennes appartenant aux trois genres amibiens les plus répandus (*Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella*) a été testée avec deux souches de *L. pneumophila* (*L. pneumophila* Lens et une souche de *L. pneumophila* environnementale). L'influence des paramètres température (25°C, 30°C et 40°C) et MOI (Multiplicity Of Infection ; 0.1 et 10) a été testée. Pour ce faire, un suivi des populations de légionelles, après co-culture avec les différentes souches d'amibes, a été réalisé sur gélose GVPC à t0, t24, t48 et t72h. Dans nos conditions, la prolifération de *L. pneumophila* a été possible pour toutes les souches amibiennes testées. Les résultats montrent que les deux souches de *L. pneumophila* ont un comportement similaire. Le genre amibien n'apparaît pas comme étant un paramètre prépondérant ; les différences inter-souches d'un même genre étant parfois plus grandes qu'entre deux souches d'un genre différent. La température a une forte influence sur la multiplication des légionelles. A 25°C la prolifération

intra-amibienne de *L. pneumophila* semble inhibée ou fortement retardée. La MOI a également montré un impact sur la vitesse de prolifération. L'amélioration des connaissances sur l'incidence de ces paramètres peut permettre de mieux appréhender les risques de colonisation des réseaux d'eau et des circuits à tours aéro-réfrigérantes. La température, en particulier, est un facteur déterminant qui pourrait aider à localiser les zones les plus à risques dans ces installations. Par ailleurs, *L. pneumophila* semble être capable de s'adapter à son hôte amibien pour s'y multiplier.

Certification d'une méthode de quantification par PCR en temps réel de *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* dans des échantillons d'ECS et de TAR selon les spécifications de la norme NF T 90-471.

P5

C. OGER-DUROY¹, A. QUINTANAR¹, C. MAZURE¹, J.-P. TOURNIAIRE¹, C. GUILLAUME², A. TOURON-BODILIS³ et M. BINET³, M. MAUX⁴

¹ Bio-Rad, Food Science Division, 3 Bvd Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette, France

² Ajilon Engineering, Energie-Environnement, 88ter avenue du Général LECLERC 92100 Boulogne Billancourt, France

³ EDF, Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement, 6 quai Watier, F-78401, Chatou cedex, France

⁴ IPL santé, environnement durables Nord, 1 rue du Professeur Calmette, 59046 Lille Cedex, France

La détection et la quantification rapide des bactéries du genre *Legionella* représentent un enjeu majeur pour répondre au risque sanitaire lié à ce microorganisme. Bio-Rad a développé une nouvelle génération (i) de kit d'extraction d'ADN à partir d'échantillons d'eaux chaudes sanitaires (ECS) et de tours aéro-réfrigérées (TAR) et (ii) de kits de quantification par PCR en temps réel des microorganismes *Legionella* spp et *Legionella pneumophila*.

Ces kits, intégrant une nouvelle chimie de détection des cibles PCR par sondes doubles brins, répondent aux exigences de la norme AFNOR NF T 90-471, et permettent d'atteindre les niveaux de performances requis (Certification NF VALIDATION N°iQ-Check™ *Legionella* spp.: BRD 07/15 -12/07; iQ-Check™ *L. pneumophila*: BRD 07/16 -12/07). Ils intègrent une gamme de standards de quantification ainsi qu'un matériau de référence raccordés à l'étalon primaire.

Pour faire face à la diversité des eaux à analyser, le protocole Aquadien™ est proposé pour les eaux « filtrables ». Tout en répondant aux exigences de rendements/robustesse à l'extraction d'ADN de la NF T 90-471, un protocole complémentaire (W2-Aquadien™) permet d'analyser par PCR des échantillons d'eaux de TAR difficilement filtrables et particulièrement riches en inhibiteurs de PCR. Ce nouveau protocole validé a été testé sur échantillons d'eaux de circuits de TAR particulièrement difficiles, fournis par EDF (Electricité de France).

Occurrence des légionelles dans les eaux thermales Tunisiennes.

P6

N. CHAFTAR^{1,2}, **F. KOLSI**³, **S. JARRAUD**⁴, **J.-M. BERJEAUD**², **K. HANI**¹, **J. FRERE**² et **T. GHRAIRI**¹

¹ UR08/45, Département de Biochimie, Faculté de Médecine Ibn ElJazzar, Av. Karoui 4002 Sousse, Tunisie

² Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau, UMR 6008 Poitiers

³ Office du Thermalisme, 10, Rue de Médine – 1002 Tunis, Tunisie

⁴ Centre National de Référence Légionelles, CHU Lyon, 69600 Lyon

Avec le soutien du Programme Hubert Curien UTIQUE et de la Région Poitou-Charentes

En Tunisie, plusieurs dizaines de sources d'eaux chaudes, réparties dans des hammams traditionnels ou des stations thermales, sont exploitées. Ces eaux aux propriétés spécifiques différentes sont réputées depuis l'antiquité et elles sont situées pour la plupart dans les régions montagneuses du nord. Bien qu'elles reçoivent plusieurs milliers de baigneurs par an, à notre connaissance, aucune étude à ce jour n'a porté sur la caractérisation des légionelles présentes dans ces eaux. L'objectif de ce travail était donc de réaliser un panorama des légionelles présentes par culture conventionnelle et par PCR en temps réel et d'étudier la diversité génétique des souches isolées.

Cette étude a porté sur l'analyse de 77 échantillons d'eaux thermales prélevées dans 3 sites du nord de la Tunisie. La quantification des légionelles par culture conventionnelle sur milieu GVPC montre la présence de légionelles dans 17 échantillons d'eau (22%). La quantification des légionelles par PCR en temps réel révèlent la présence de légionelles dans 54 échantillons d'eau (allant de 10² UG/l à 4.9 10⁵ UG/l). En général, le nombre des légionelles est faible dans les échantillons d'eaux prélevés à proximité de la source et devient plus élevé dans les échantillons d'eau prélevés dans les bassins de refroidissement, les douches et les piscines.

Dix huit souches de *Legionella* ont été isolées et caractérisées. L'identification de ces isolats par séquençage 16S montre que 16 d'entre eux appartiennent à l'espèce *pneumophila* alors que les deux autres sont assignés à l'espèce *londiniensis*. L'étude des séro-

groupes des nouvelles souches de *L. pneumophila* présentes dans ces eaux chaudes révèle qu'elles appartiennent aux sérotypes 1, 4, 6 et 8. Le sérotype 8 étant le plus dominant.

L'étude de la diversité génétique des souches de *L. pneumophila* par électrophorèse en champs pulsés (PFGE) révèle la présence de 10 pulsotypes différents. Une hétérogénéité génétique est détectée à l'intérieur des sérogroupes montrant que ces isolats sont autant de souches différentes. Par ailleurs, la comparaison des profils PGFE de nos isolats aux profils de souches de légionelles environnementales et cliniques isolées en France ne montre pas d'identité.

L'ensemble de ses résultats montre la coexistence de souches de *L. pneumophila* de sérogroupes différents dans les réseaux d'eaux de ces stations thermales.

Caractérisation moléculaire et comparaison des *Legionella pneumophila* isolées au Maroc.

P7

Mariam MEKKOUR^{ab*}, **El khalil BEN DRISS**^b, **Mohammed HASSAR**^a, **Fabien SQUINAZI**^c, **Sophie JARRAUD**^d et **Nozha COHEN**^a

^a Laboratoire de microbiologie et hygiène des aliments et de l'environnement, l'Institut Pasteur du Maroc (IPM.)

^b Laboratoire environnement et conservation des systèmes biologiques, Faculté des sciences de Tétouan, Maroc

^c Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris, France

^d Laboratoire de microbiologie, Centre National de Référence de Legionelle, Lyon, France
m.mariam06@gmail.com

Les légionelloses se présentent essentiellement comme des infections pulmonaires aiguës causées par *Legionella pneumophila* et plus rarement par d'autres espèces. Elles peuvent être nosocomiales ou communautaires souvent liées à un séjour hôtelier. Généralement l'inhalation d'aérosols générés par des sources d'eau contaminées : douches, système de distribution, tours aéro-réfrigérantes...etc., sont à l'origine de ces infections. Notre étude porte sur la caractérisation moléculaire de 55 souches environnementales de *L. pneumophila* isolées à partir du réseau hydrique de 40 établissements hôteliers situés au niveau du Maroc, dans le but de comparer les profils génétiques. Sur l'ensemble des souches isolées, le sérotype 1 a été retrouvé dans la plupart des échantillons avec un pourcentage de 75% contre 25% seulement pour le sérotype 2-15. La comparaison par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de 40 souches de *Legionella pneumophila* sérotype 1 isolées retrouve six profils différents, dont certains sont présents au niveau de plusieurs établissements. Ces profils sont comparés à la banque de données du centre national de référence des *Legionella* (CNRL), on a retrouvé des pulsotypes qui sont à 100 % de similitude avec la souche Paris. Par ailleurs la comparaison de 15 souches de *Legionella pneumophila* sérotype 2-15 retrouve trois profils différents pour le sérotype 6, ces mêmes souches sont également comparées à la banque de données du CNRL, sans retrouver de similitudes entre les différents pulsotypes.

L'électrophorèse en champ pulsé a démontré l'existence de différents profils moléculaires de *Legionella pneumophila* qui existe au niveau du Maroc, Elle nous a permis aussi de conclure qu'un même réseau est contaminé par un ou plusieurs pulsotypes différents.

Mots clés : Eau chaude sanitaire, *Legionella pneumophila*, Légionellose, électrophorèse en champs pulsés, typage moléculaire.

Etude du rôle d'un système potentiel de sécrétion dans la virulence de *Legionella pneumophila*.

P8

F. FUCHE, C. ANDREA, D. ATLAN, P. DOUBLET et C. GILBERT*

UMR5240, Unité Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, CNRS - Université de Lyon - Université Lyon 1, 10 rue Dubois 69622 Villeurbanne cedex, France

* christophe.gilbert.bio@univ-lyon1.fr

Dans l'environnement, *Legionella pneumophila* infecte principalement les amibes de l'eau et du sol (par exemple les amibes du genre *Acanthamoeba*). Chez l'homme, de façon opportuniste, elle peut infecter les macrophages alvéolaires. Après internalisation dans une vacuole de la cellule-hôte, la bactérie échappe à la dégradation, notamment en modifiant cette vacuole par le recrutement à sa surface de vésicules dérivées du réticulum endoplasmique (RE) de l'hôte et en bloquant sa fusion avec les lysosomes, blocage essentiel et très précoce dans le cycle de virulence.

A partir d'une étude bioinformatique des génomes de *Legionella*, deux gènes codant pour des protéines homologues à des composants du Système de Sécrétion de Type I (T1SS) HlyBD présent chez les souches bactériennes *Escherichia coli* pathogènes ont été identifiés.

Afin d'étudier le rôle des protéines codées par ces deux gènes de *Legionella*, plusieurs approches ont été entreprises. Le rôle potentiel de ces protéines dans la sécrétion ou l'efflux est en cours d'étude. Par ailleurs, des mutants invalidés pour les gènes *lssBD* ont été construits chez *Legionella pneumophila* Lens et Paris. Lors de l'infection de l'amibe modèle *Acanthamoeba castellanii*, une souche invalidée pour ces deux gènes présente une avirulence comparable à une souche $\Delta dotA$ (qui est rapidement dégradée dans le phagosome). Le gène *dotA* est en effet essentiel à la virulence et code pour une protéine du système de sécrétion de type IV responsable de la sécrétion de plus d'une centaine d'effecteurs chez *Legionella*. Une virulence normale a pu être restaurée par l'apport d'une copie sauvage des gènes *lssBD* sur un plasmide

dans la souche invalidée. Des infections d'une autre amibe modèle *Dictyostelium discoideum* ont été suivies par microscopie confocale grâce à l'utilisation de souches de *Legionella pneumophila* Lens exprimant la mCherry (protéine fluorescente rouge). Une heure après le début de l'infection, la souche sauvage a été internalisée et a recruté du RE autour de sa vacuole. En revanche, dans le cas du mutant $\Delta lssBD$, après une heure d'infection, aucune bactérie n'est retrouvée dans la cellule-hôte et aucun recrutement du RE n'est visible (suivi par marquage de la calnexin à l'aide d'une fusion avec la Green Fluorescent Protein).

Ces résultats démontrent le caractère essentiel de ces deux gènes *lssB* et *lssD* dans l'entrée de la bactérie dans la cellule-hôte, c'est-à-dire pour une des toutes premières étapes de l'infection. Jusqu'à présent, seul le système *dot/icm* était rapporté comme indispensable à une infection réussie, car permettant d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Les études en cours confirmeront ou non le caractère *dot/icm*-indépendant du mécanisme impliqué dans l'action des protéines *LssB-LssD* et les étapes du cycle infectieux nécessitant la présence des protéines *LssB-LssD* fonctionnelles.

Colonisation du réseau d'eau chaude sanitaire de la ville de Rennes par une souche de *Legionella pneumophila* jamais impliquée dans une épidémie.

P9

P. LE CANN^{1*}, D. SOBRAL^{2,3,4}, A. GERARD¹, S. JARRAUD^{5,6,7}, B. LEBEAU⁴, F. LOISY-HAMON⁴, G. VERGNAUD^{2,3,8} et C. POURCEL^{1,2}

¹EHESP (École des Hautes Études en Santé Publique), Avenue du Professeur Léon-Bernard, 35043 Rennes, France, ²Univ Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, Orsay, F-91405, France, ³CNRS, Orsay, F-91405, France, ⁴Ceeram (Centre Européen d'Expertise et de Recherche sur les Agents Microbiens), Allée de la Filée, 44244 La Chapelle sur Erdre, France, ⁵Université de Lyon, France, Centre National de Référence des Legionella, ⁶INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France, ⁷Hospices Civils de Lyon, France, ⁸DGA/MRIS- Mission pour la Recherche et l'Innovation Scientifique, 92221 Bagneux, France

* Pierre.Lecann@ehesp.fr

Deux épidémies de légionellose ont eu lieu à Rennes en 2000 et 2006 nécessitant la mise en place d'une surveillance accrue du réseau d'eau chaude sanitaire et des tours aéro-réfrigérantes. Plus de 1000 souches de *Legionella pneumophila* ont ainsi été isolées depuis 2000. Pour caractériser cette collection, une méthode de typage haut débit automatisée a été développée. La méthode MLVA pour Multiplex capillary-based Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analysis permet une très bonne discrimination des souches pour un temps d'analyse réduit par rapport à la méthode PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) ou le SBT (Sequence Based Typing). Douze locus sont amplifiés simultanément et le typage d'une souche ne requière ainsi qu'une seule réaction d'amplification PCR et une analyse sur un seul capillaire.

Deux cent dix sept souches environnementales collectées entre 2000 et 2009 à Rennes et 5 souches cliniques collectées pendant les épidémies de 2000 et 2006 ont été analysées. Quinze génotypes différents ont été identifiés. Un groupe majeur de souches isolées exclusivement à partir des réseaux d'eau chaude sanitaire et possédant des génotypes proches, représente 77% des isolats étudiés. La comparaison avec des données publiées accessibles via <http://mlva.u-psud.fr> montre que des souches de même génotype MLVA ont été associées ailleurs dans le monde à des cas de légionellose. Le reste des souches est réparti

dans 3 complexes clonaux. Les souches isolées chez les malades présentent le même génotype qu'une souche isolée dans la tour aéro-réfrigérante d'un centre commercial, confirmant les résultats obtenus précédemment par le CNR par la méthode PFGE.

Cette étude illustre l'importance des facteurs environnementaux dans l'expression de la pathogénicité de *Legionella pneumophila* et l'utilité d'une méthode de typage haut débit, rapide et peu onéreuse, pour étudier l'origine des cas de légionellose. Un kit commercial permet d'effectuer cette analyse (TYPLEGIO CeeramTools®, Ceeram, Nantes).

Le passage dans *Tetrahymena tropicalis* augmente la résistance au stress et l'infectiosité de *Legionella pneumophila*.

P10

Mohamad KOUBAR ¹, Marie-Hélène RODIER ¹, Rafael A. GARDUÑO ² and Jacques FRÈRE ¹

¹ Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 6008, Poitiers University, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers cedex, France

² Department of Microbiology and Immunology, and Department of Medicine – Division of Infectious Diseases, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, B3H 4H7, Canada

L. *pneumophila* est une bactérie Gram-négative présente dans les eaux de surface qui peut proliférer dans les installations où elle trouve des conditions favorables à sa multiplication (circuits de refroidissement, installations sanitaires, tours aéroréfrigérantes, etc.). La transmission vers l'Homme se produit par l'inhalation de gouttelettes contaminées par cette bactérie. Dans l'environnement, *L. pneumophila* se multiplie à l'intérieur de protozoaires, principalement les amibes. Sa multiplication dans les amibes augmente sa survie dans l'eau et son infectiosité.

Les ciliés du genre *Tetrahymena* sont omniprésents dans les eaux douces de surface et sont capables de supporter la multiplication de *L. pneumophila*. Chez *T. tropicalis*, les légionelles en phase stationnaire se différencient en formes matures intracellulaires (MIF), sans réplication bactérienne apparente.

Nos résultats montrent que les MIF libérées de *T. tropicalis* survivent mieux dans un environnement pauvre en nutriments et sont plus infectieuses pour les pneumocytes humaines que les bactéries en phase stationnaire.

Nos résultats montrent que ces ciliés jouent un rôle important dans l'écologie de *Legionella* et suggèrent qu'il faudrait mieux les prendre en compte dans la gestion du risque légionelles.

Evaluation de trois méthodes normalisées pour la détection des légionelles dans les eaux.

P11

O. CHALLEMEL, M. ADNANE, D. CARLIER, S. DUBROU, F. ENKIRI, I. LEGAIGNEUR-MEUNIER et F. SQUINAZI

Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris, 11 rue George Eastman 75013 Paris
damien.carlier@paris.fr

Parmi les nombreuses méthodes développées pour la détection et le dénombrement des légionelles dans les eaux, trois font l'objet d'une normalisation AFNOR.

La première méthode est basée sur la culture par ensemencement direct ou par ensemencement après concentration de l'échantillon (norme NF T90-431), la seconde repose sur la croissance des bactéries retenues sur une membrane après filtration de l'échantillon et dépôt sur milieu de culture (norme NF EN ISO 11731-2), la troisième, fait appel à une amplification génique par PCR quantitative en temps réel (norme NF T90-471).

Ces trois méthodes ont des domaines d'application différents, la seconde étant exclusivement réservée à des eaux propres. Actuellement, seule la méthode décrite par la norme NF T90-431 est reconnue par la réglementation française, en particulier les arrêtés du 13 décembre 2004 pour les tours aéroréfrigérantes et du 1^{er} février 2010 pour les eaux chaudes sanitaires.

Pour l'évaluation de ces 3 méthodes normalisées, des échantillons d'eau de nature différente ont été analysés en parallèle. Les sensibilités de ces méthodes sont différentes. Notre étude montre que la méthode décrite par la norme NF T90-431 présente une moins bonne sensibilité que celle de la norme NF EN ISO 11731-2. Par ailleurs, cette dernière est plus simple et rapide à réaliser et présente un coût inférieur. Toutefois, un inconvénient souvent avancé est la difficulté de lecture en présence d'une flore annexe abondante. De tels problèmes n'ont pas été rencontrés dans l'étude préliminaire, la décontamination

acide à pH 2,0 a permis de réduire la flore annexe, y compris pour des échantillons d'eau de tours aéroréfrigérantes. Ces premières constatations demandent à être confirmées sur un plus grand nombre d'échantillons obtenus par prélèvements réalisés sur des premiers jets où la flore annexe est souvent abondante. Si ces résultats sont confirmés, la méthode NF EN ISO 11731-2 pourrait représenter une alternative intéressante à celle de la norme NF T 90-431 en particulier pour les eaux propres délivrées dans les services hospitaliers à haut risque.

La méthode de PCR quantitative présente également une alternative à la méthode NF T90-431 par culture. Cependant le problème de la conversion entre les unités génomiques et les unités formant colonie reste difficile à appréhender. Le rapport de l'Anses d'avril 2011, propose des valeurs cibles pour la méthode par PCR qui reposent sur un avis d'experts en l'état actuel des connaissances, mais la réglementation française en vigueur impose la norme NF T90-431 Néanmoins, du fait de sa rapidité, la méthode par PCR quantitative pourrait être utilisée par exemple pour le contrôle post désinfection avant réouverture d'un établissement recevant du public ou pour la surveillance des installations soumises à désinfection continue.

Formation de biofilms naturels en présence de *L. pneumophila* et rôle du fer.

P12

Emilie PORTIER, Jérôme LABANOWSKI et Yann HÉCHARD*

Laboratoire Chimie et Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers, CNRS UMR 6008, 1 rue G. Bonnet, 86022 Poitiers Cedex

* yann.hechard@univ-poitiers.fr

Dans l'environnement naturel ou les réseaux d'eau, *L. pneumophila* est retrouvée principalement dans les biofilms, où elle se développe en association avec les amibes. Les biofilms sont des communautés microbiennes adhérentes à une surface. Ces communautés sont souvent complexes, bien qu'il existe des biofilms où une espèce bactérienne peut être largement majoritaire. *L. pneumophila* est présente dans des biofilms qui sont probablement multi-espèces et dans lesquels *L. pneumophila* n'est probablement pas l'espèce principale. Même s'il est parfois utile de former des biofilms monoespèce, ce modèle reste éloigné de la réalité de *L. pneumophila* et cette bactérie forme difficilement de tels biofilms. Il nous semble donc important d'étudier *L. pneumophila* dans un environnement qui soit le plus proche possible des conditions naturelles. Dans ce but nous avons développé un modèle de formation de biofilms naturels en utilisant de l'eau de rivière, qui peut être dopée avec *L. pneumophila*. La formation de ces biofilms est suivie par microscopie et les bactéries totales ainsi que *L. pneumophila* sont énumérées par PCR quantitative. Différentes souches de *L. pneumophila* sont comparées par cette méthode.

Dans un second temps, nous avons initié des travaux visant à étudier le rôle du fer dans l'implantation de *L. pneumophila* dans ces biofilms. En effet, le fer est un élément essentiel à la croissance de *L. pneumophila* et des travaux antérieurs avaient montré une surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme du fer lorsque *L. pneumophila* était sous forme de biofilm. Pour cela, l'eau de rivière a été dopée en fer à différentes concentrations et, de la même façon que précédemment, la formation des biofilms a été suivie

par microscopie et les bactéries énumérées par PCR quantitative. La concentration en fer dans le biofilm est également suivie. La concentration en fer utilisée pour le dopage semble avoir peu d'influence sur l'implantation de *L. pneumophila*. Cependant la présence de fer dans le biofilm n'est pas corrélée à la concentration utilisée pour le dopage de l'eau, suggérant des interactions complexes entre éléments et biofilms.

En conclusion, le nouveau modèle de biofilm mis en place doit aider à mieux comprendre le développement de *L. pneumophila* dans l'environnement et il permettra de comparer différentes souches, sauvages ou mutantes pour leur capacité d'implantation dans les biofilms.

Présence et persistance de *Legionella* dans l'eau des tours aéroréfrigérantes d'hôtel et l'eau de robinets des hôpitaux publics de Phnom Penh, Cambodge.

P13

S. L. KRUY¹, V. YITH¹, D.R. MUT¹, B. H. SUY¹, J.-L. SARTHOU¹, C. BUCHRIESER², and S. JARRAUD³

¹ Laboratoire de microbiologie alimentaire et analyse des eaux, Institut Pasteur du Cambodge, Cambodge ; ² Unité de biologie de bactérie intracellulaire, Institut Pasteur Paris, France ; ³ Centre National de référence de *Legionella*, Lyon, France
ksunlay@pasteur-kh.org

De juillet 2009 à mai 2010, régulièrement une fois toutes les 2 semaines, l'étude a évalué la présence de *Legionella* dans l'eau de tour aéroréfrigérante (TAR) de 6 hôtels (T1, T2, T3, T4, T5, et T6) et l'eau de robinet de 6 hôpitaux publics (PA, PB, PC, PD, PE, et PF), ces sites sont localisés dans la ville de Phnom Penh. La recherche et le dénombrement de *Legionella* ont été effectués par la méthode NFT 90-431.

Au total 108 échantillons d'eau de TAR des hôtels ont été analysés, 84,3% des échantillons étaient contaminés par des *Legionella*. Des *Legionella pneumophila* (Lp) Sg 1 étaient positives dans 46,3% et des Lp Sg 4, 5, 7, 8, 10, 13 et RC (réaction croisée avec d'autres sérogroupes) étaient positives pour 28,7% des échantillons. Les *Legionella* comme *L. londinensis*, *L. quinlivanii* et *L. spp* étaient positives pour 9,3%.

Durant cette même période, 108 échantillons d'eau de robinet des hôpitaux ont été analysés, et 26,9% des échantillons étaient contaminés par *Legionella*. Des Lp Sg 1 étaient positives pour 3,7% et des Lp Sg 5, 8, 13 et RC étaient positives dans 20,4% des prélèvements. Les *Legionella erythra* étaient positives dans 2,8% des prélèvements d'eau de robinet.

La contamination de l'eau des TAR des hôtels par des *Legionella* était significativement plus élevée que l'eau de robinets des hôpitaux ($p < 0.05$).

Dans le cas de prélèvements positifs, chaque hôtel a fait assainir l'eau de sa TAR; par exemple, les Lp de la TAR de l'hôtel T3 étaient de Sg 1 et 5 et cette TAR était positive dès le 1^{er} prélèvement à 1.250 CFU/L, puis le taux des *Legionella* atteignait 40.000 CFU/L au 2^{ème} prélèvement. L'utilisation par l'hôtel de produits aseptiques a permis d'abaisser ces *Legionella* au dessous du seuil de détection aux 3^{ème} et 4^{ème} prélèvements, mais au 5^{ème} prélèvement la TAR de l'hôtel T3 était à nouveau contaminée à 3.000 CFU/L, et les prélèvements suivants ont été variés à des valeurs ≤ 1.000 CFU/L. Finalement on notait une valeur élevée à 400.000 CFU/L au 16^{ème} prélèvement, due au lâchement d'un traitement continu par l'hôtel.

On a observé la même tendance d'assainissement puis de relâchement dans ce suivi de traitement de l'eau des TAR pour les 5 autres hôtels intégrés dans notre étude.

Concernant des échantillons de l'eau de robinets des hôpitaux, le point d'eau chaude sanitaire de la salle de néonatalogie de l'hôpital PA contenait des Lp Sg 1 et RC du 1^{er}- 4^{ème} prélèvement. Comme mesures de prévention, l'hôpital a fermé le robinet d'eau chaude et a conservé le robinet d'eau froide, négativant par la suite les autres prélèvements de ce site. A l'hôpital PB, le prélèvement d'eau était effectué au niveau du robinet de la salle de chirurgie infantile. Tous les prélèvements exceptés 2, étaient positifs pour Lp Sg 1, 5, 8, 13, RC (≤ 2.000 CFU/L) et *Legionella erythra* (≤ 2.500 CFU/L), mais aucune action d'assainissement n'a été entreprise par l'hôpital. Les 2 autres points d'eau de prélèvements pour des hôpitaux PC et PE étaient des robinets de bassins de stockage qui reçoivent l'eau directement de la régie des eaux de la ville. A l'hôpital PC, au 10^{ème} prélèvement, l'eau contenait des Lp Sg 1 (100 CFU/L) et au 11^{ème} prélèvement, des *Legionella erythra* (100 CFU/L). Dans l'hôpital PE, les 1^{er}, 2^{ème} et 4^{ème} prélèvements d'eau contenaient des Lp Sg 1 et 13 (≤ 150 CFU/L). Les autres prélèvements pour ces deux hôpitaux étaient négatifs.

Pour les hôpitaux PD et PF pour lesquels les robinets d'eau de toutes les salles étaient directement branchés à l'eau de la ville, les 18 prélèvements bihebdomadaires d'eau de ces deux hôpitaux étaient tous négatifs.

La concentration de chlore résiduel dans l'eau de la ville étaient de 0,2 mg/L - 0,5 mg/L ce qui permettait de réduire la charge de *Legionella* à des valeurs inférieures à 100 CFU/L.

En conclusion, les *Legionella* sont présentes au Cambodge dans des TAR des hôtels et dans l'eau de robinet des hôpitaux. Le traitement de l'eau des TAR a réduit la concentration de *Legionella* à un niveau tel qu'il n'était pas possible d'analyser leur diversité. Toutefois, lorsque la concentration de *Legionella* revenait à son niveau initial, les sérogroupes de *Legionella* étaient plus ou moins identiques à ceux identifiés avant le traitement. Cela montre clairement que même si le traitement d'eau a induit un changement dans la structure de la population de *Legionella*, son effet n'est que transitoire. Ces données montrent également que la chloration permanente des sources d'eau conduit à une réduction effective de *Legionella*.

Diversité et dynamique des légionelles dans un circuit de refroidissement de centrale nucléaire en bord de Loire.

P14

D. JAKUBEK ^{1,2*}, **M. LE-BRUN** ¹, **G. LEBLON** ², **M. DUBOW** ² et **M. BINET** ¹

¹ Institut de Génétique et de Microbiologie (IGM) – UMR8621 – Université Paris Sud 11 – AgroParisTech – 91405 Orsay cedex ; ² EDF R&D, Département LNHE, 6, quai Watier, 78400 Chatou

*delphine.jakubek@edf.fr

Les circuits de refroidissement semi-fermés des centrales nucléaires, favorisent par leur mode de fonctionnement la prolifération d'organismes thermophiles. Parmi ces micro-organismes figure l'espèce *Legionella pneumophila*, bactérie pathogène pour l'homme et responsable de plus de 98% des cas de légionellose en France.

Pour évaluer le risque microbiologique associé à la présence de ce pathogène dans les circuits de refroidissement, il est essentiel d'améliorer les connaissances sur l'écologie des légionelles dans les circuits.

L'objectif de cette étude est de caractériser la diversité et la dynamique temporelle des légionelles dans un circuit de refroidissement sur une période d'une année et mettre en évidence les corrélations des facteurs biotiques et abiotiques environnants avec la diversité et la dynamique des légionelles.

Des campagnes de prélèvement d'eau issue de circuit de refroidissement en bord de Loire ont été réalisées entre Mars 2010 et Mars 2011 avec une périodicité mensuelle. Chaque échantillon a fait l'objet d'analyses microbiologiques et physico-chimiques. Les légionelles isolées de ces échantillons ont été génotypées par la méthode de typage moléculaire Infrequent Restriction Site Polymerase Chain Reaction (IRS PCR).

Cette étude a permis de découvrir que les populations de légionelles se développant dans l'eau des circuits de refroidissement présentent un fort degré de diversité qui varie au cours de l'année. Ce degré de diversité est caractérisé par la dominance de certains types IRS PCR qui peuvent représenter jusqu'à 50% de la population de légionelle et par la proportion im-

portante des types rares (ne dépassent pas les 10% tout au long de l'année) qui forment un groupe (appelé groupe Bruit de Fond) représentant jusqu'à 40% de la population de légionelle. La dynamique des légionelles est caractérisée par l'association et la compétition entre différents types IRS PCR. Cette étude a également permis de montrer qu'il existe une étroite corrélation entre les concentrations en légionelles et la dynamique du groupe Bruit de Fond.

Le typage moléculaire par la méthode IRS PCR permet une étude approfondie de la diversité et de la dynamique des légionelles dans les circuits de refroidissement des centrales nucléaires. Cette méthode permet d'identifier de manière très précise les légionelles se développant dans les circuits et de décrire les mécanismes écologiques régissant les populations de légionelles.

Evaluation of a new MWY media for detection and enumeration of *Legionella* spp and *L. pneumophila* in highly contaminated water samples.

P15

Simon IN'T VELD, Rik THIJSEN

Vitens N.V., Postbus 1090, 8200 BB Lelystad, Bezoekadres Reactorweg 47, 3542 AD Utrecht, The Netherland

Water samples can be split in two types: clean water (like hot sanitary water) and highly contaminated water, like waters coming from cooling-towers. Especially this last type generates a high background flora (moulds, yeasts, gram negative bacteria) that can hide *Legionella* colonies and lead to impossibility to express the results.

MWY medium (Modified Wadowski and Yee) is derived from GVPC and BCYE media but includes an antibiotic mix that allows a greater selectivity against the background flora and 2 indicators that allow a differentiation between some of the *Legionella* species.

The aim of this study was to evaluate the performance of the new bioMérieux pre-poured MWY medium in comparison with home made MWY and BCYE + antibiotics, prepared from dehydrated media and used as a reference at Vitens, and to make a comparison with the GVPC medium (usually recommended by ISO standards). This study has been carried out on naturally highly contaminated environmental water samples. Enumerations and level of background flora contamination were observed.

Out of 201 samples tested, 82 (40%) were found to be positive for *Legionella* species (*L. pneumophila* SG1, SG 2-14 and *Legionella* other than *L. pneumophila*).

Regarding enumerations, the bioMérieux MWY showed satisfying results with no statistical differences compared to other media (GVPC bioMérieux, home made MWY and BCYE+ antibiotics) with non-significant biases (0 included in 95% confidence intervals). Regarding the inhibition of background flora, the bioMérieux MWY showed the best result of the study with only 11.8% of inoculated plates presenting

more than 50% of plate coverage by background flora against 19.5% and 19.7% for pre-poured GVPC and home made MWY and BCYE + antibiotics.

According to these results, the bioMérieux ready-to-use MWY is a good alternative to GVPC especially for the analysis of highly contaminated waters thanks to its better selectivity against yeasts, moulds and other gram negative bacteria while showing satisfactory performances in terms of enumeration. Future ISO method could propose the introduction of MWY medium as the most suitable medium for samples with a high level of background flora.

Réflexion sur le diagnostic des légionelloses en 2010 au CHU de Grenoble.

P16

Isabelle PELLOUX¹, Christine RECALE¹, Pierre FOURNIER, Max MAURIN¹, Marie Reine MALLARET², Annick LAGIER¹, Laurence PERRIN¹ et Jacques CROIZÉ¹

¹ Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et Pathologie, ² Unité d'hygiène CHU de Grenoble, Grenoble, France
jcroize@chu-grenoble.fr; ipelloux@chu-grenoble.fr

Nous avons voulu mener une réflexion sur les méthodes utilisées pour le diagnostic biologique des légionelloses au CHU de Grenoble où nous avons en moyenne une trentaine de cas de légionellose par an.

En 2010, 28 cas de légionellose ont été diagnostiqués au laboratoire de Bactériologie du CHU par antigénurie *Lp1* (AGU). Quatre méthodes diagnostiques ont été pratiquées et les résultats obtenus sont décrits ci-après

- **Antigénurie *Lp1*** (Binax Portland ME USA) : 1539 tests effectués (urines concentrées) sur prescription médicale ; 28 positifs (100% des patients) soit 1,8% des tests (coût des tests AGU : 26932 euros HT)

- **Cultures** (géluses BCYE (Oxoid)) : 985 cultures ensemencées soit systématiquement (LBA) soit en cas de positivité de l'AGU (aspirations trachéales et expectorations). Aucune positivité sur les prélèvements systématiques et seulement 53% des patients AGU (+) ont eu un prélèvement respiratoire (15/28). 7 cultures positives, soit 0,71% de celles effectuées et 46% (7/15) des prélèvements pulmonaires obtenues chez les patients à AGU positifs (coût des cultures : 689 euros HT).

- **PCR en temps réel** (gènes amplifiés ADNr16S et *mip*) : 11 PCR effectuées sur des patients AGU + avec 63% de positivité (7/11) ; deux cas avec PCR (+) et Cultures (-)

- **Sérologie** : 1082 sérologies par technique ELISA (BIO advance). 12 patients avaient une sérologie positive confirmée par le CNR Legionella avec un titre

anticorps ≥ 256 . Deux sont associés à une AGU (+) ; 10 à une AGU (-). Parmi ces 10 patients, deux avaient des taux élevés (1024) l'un en *Lp4* /*Lp9*, l'autre en *Lp8*. (Coût 2400 euros HT)

Commentaires : 1- Notre incidence de légionellose élevée en Isère (5,1/100 000 hbts en 2009) justifie la recherche d'AGU en cas de pneumonie hospitalisée. 2- Les cultures de LBA devraient être mieux ciblées. 3-La PCR, utile pour les patients sous antibiothérapie (2 cas ici) et pour le suivi devrait être de plus en plus utilisée avec la mise à disposition de tests commercialisés. 4- La sérologie souvent considérée comme inutile car tardive, permet néanmoins de détecter des légionelloses probables non *Lp1*, actuellement non retenues par l'InVS.

Apport de la coculture amibienne dans le diagnostic et l'investigation des cas de légionellose. Analyse prospective sur une période de 32 mois.

P17

G. DESCOURS¹, A. SUET¹, C. GINEVRA¹, S. SLIMANI¹, C. CAMPESE², D. CHE², F. ADER¹, G. LINA¹ et S. JARRAUD¹

¹ Centre National de Référence des Légionelles, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon – Université Lyon 1, Lyon
² Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, France

Introduction : *Legionella* est un pathogène intracellulaire responsable de pneumopathies de gravité variable, parfois mortelles. Dans les environnements aqueux, *Legionella* est capable de se multiplier au sein d'amibes libres. Celles-ci jouent ainsi un rôle central dans l'écologie et la pathogénie de la bactérie.

Le diagnostic initial de légionellose repose sur la détection d'antigènes urinaires. L'isolement de la souche de *Legionella* reste cependant une étape indispensable aux investigations épidémiologiques.

Objet de l'étude : Aucune étude comparant culture axénique et coculture amibienne n'est décrite dans la littérature. Nous avons évalué l'apport de la coculture amibienne dans le diagnostic de légionellose et dans l'isolement de souches à partir de prélèvements respiratoires.

Méthodes : 348 patients ont été inclus entre avril 2008 et novembre 2010. Un cas de légionellose était défini par une antigénurie, une culture et/ou une coculture positive(s). Une culture axénique (milieux BCYE, GVPC et BMPA) et une coculture amibienne (*Acanthamoeba polyphaga* et *A. castellanii*) ont été effectuées sur 379 prélèvements respiratoires adressés au CNR *Legionella* durant cette période. La suspension d'amibes était ensemencée sur milieux BCYE et BMPA après 3 et 6 jours de coculture.

Résultats : 222 cas de légionellose ont été diagnostiqués, dont 2 par coculture seule (antigénurie et culture négatives). La culture axénique a démontré une sensibilité supérieure à la coculture amibienne: 42,1% versus 33,8%. L'association des deux techni-

ques atteignait une sensibilité de 47,1%. Pour 12 prélèvements respiratoires, l'isolement de la souche était obtenu par coculture seulement; 100% des cultures correspondantes étaient contaminées par une abondante flore oro-pharyngée.

Conclusion : Nous avons montré que la culture axénique était plus sensible que la coculture amibienne. Cependant, la coculture se montre particulièrement pertinente sur des prélèvements respiratoires contaminés. Les amibes réduisent la flore commensale oro-pharyngée et renforcent la multiplication de *Legionella*. La mise en œuvre de la coculture amibienne pourrait être ainsi limitée aux prélèvements pour lesquels la culture axénique est contaminée à 24 heures.

Persistance et diversité de souches de *Legionella pneumophila* isolées d'une source d'eau contaminée. P18

Z. CHAABNA¹, F. FOREY², M. REYROLLE, S. JARRAUD², D. FONTVIELLE¹ et D. ATLAN^{3*}

¹ UMR CARTELE Université de Savoie-INRA 73376 Le Bourget du Lac cedex

² Centre National de Référence des *Legionella*, Hospices Civils de Lyon, Laboratoire de Bactériologie INSERM U851, Faculté de Médecine 69372 Lyon cedex 08

³ UMR5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Université Lyon 1, 10 rue Dubois, 69622 Villeurbanne cedex daniele.atlan@univ-lyon1.fr

Legionella pneumophila du sérotype 1 (*Lp1*) est souvent associée à la légionellose, une pneumonie atypique résultant de l'inhalation d'aérosols contaminés générés par des tours aéroréfrigérantes, des centres thermaux, des spas ou des systèmes de distribution d'eau. *L. pneumophila* est une bactérie intracellulaire facultative capable de se multiplier dans les macrophages des alvéoles pulmonaires, puis dans les pneumocytes. Dans l'environnement, les protozoaires (amibes) sont les hôtes naturels de cette bactérie pathogène.

Dans les années 80 en France, une source alimentant des thermes régionaux a été suspectée être à l'origine en 10 ans d'une quarantaine de cas de légionellose certain ou probable, malgré des mesures de désinfection. *Lp1* était responsable de la moitié des cas de légionellose ; pour les autres cas, étaient impliquées des *Lp3*, *Lp6* et *Lp12* (respectivement 17, 11 et 2%). Il était intéressant de savoir, 30 ans plus tard, quelles légionelles persistaient dans cette source qui n'alimente plus les thermes.

Afin de caractériser les *Legionella pneumophila* susceptibles de s'être installées durablement dans la source, ces bactéries ont été isolées à partir de biofilms s'étant développés sur des lames de verre plongées dans cette source ; ces biofilms ont été ensuite remis en suspension dans de l'eau stérile et traités selon la procédure AFNOR NFT90-341 qui favorise l'élimination de nombreuses bactéries autres que *Legionella*. Après dépôts d'aliquotes de ces suspensions sur milieu BCYE, 32 colonies bactériennes ont été analysées sur la base des paramètres suivants : aspect des colonies, auxotrophie en cystéine, amplification par PCR des gènes 16S rRNA et *mip*. Ces analyses ont conduit à conserver 29 isolats appartenant au genre *Legionella*. Puis, un typage

moléculaire a permis une classification plus précise: (1) l'amplification par PCR du gène *lpg1905* a montré que les 29 isolats appartenaient à l'espèce *pneumophila* ; (2) l'amplification des gènes *lpg0774* et *wzm* chez 8 isolats a conduit à leur classification dans le sérotype 1. Enfin, l'utilisation d'anticorps spécifiques a confirmé l'appartenance au sérotype 1 pour les 8 isolats précédemment identifiés et mis en évidence la présence de deux autres sérotypes, à savoir les sérotypes 10 (5 isolats) et 12 (16 isolats). De plus, l'analyse de l'ADN bactérien des 29 souches de *L. pneumophila* par la technique de PFGE (« Pulse Field Gel electrophoresis ») a révélé 5 profils (ou pulsotypes) différents, sans ressemblance aucune avec des profils de *Lp1* connues et référencées dans les bases de données. Il est aussi intéressant de souligner que seules les souches du sérotype 1 montrent une diversité dans leurs profils ADN.

Ainsi depuis 30 ans, les biofilms installés dans cette source ont assurés la persistance de souches de *L. pneumophila* de deux sérotypes (1 et 12), que nos tests ont confirmé très virulentes vis-à-vis de l'amibe *Acanthamoeba castellanii*. Par contre, si les *Lp6* et *Lp3* semblent avoir disparu de cette source, des *Lp10* sont présentes actuellement alors qu'elles n'avaient jamais été détectées ni dans la source étudiée, ni dans les thermes contaminés et ni dans les autres sources alimentant les thermes.

En conclusion, cette étude a mis en évidence la persistance sur plusieurs dizaines d'années de plusieurs souches de *L. pneumophila* appartenant au sérotype 1, c'est à dire celui qui le plus incriminé dans les cas de légionellose.

Traitement sur filtre au Propidium monoazide (PMA) pour la quantification des *L. pneumophila* viables mais non cultivable (VBNC) par PMA-qPCR. P19

Sami SLIMANI^{1*}, Audrey ROBYNS^{1*}, Sophie JARRAUD¹⁻³, Maelle MOLMERET²⁻³, Eric DUSSERRE²⁻³, Céline MAZURE⁴, Jean-Pierre FACON⁴, Gérard LINA¹⁻³, Jérôme ETIENNE¹⁻³ and Christophe GINEVRA²⁻³

¹ Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

² Université de Lyon, Centre National de Référence des légionelles, Lyon

³ INSERM U851, Lyon

⁴ Bio-Rad, 3 avenue Raymond Poincaré, 92 430 Marnes la Coquette, France

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail.

Cadre de l'étude : Récemment, l'Ethidium et le Propidium MonoAzide (E/PMA) ont été proposés pour réduire le signal PCR issu des bactéries mortes en pénétrant sélectivement dans les cellules endommagées et en bloquant l'amplification PCR de l'ADN bactérien après photoactivation.

Objectif : Développer un prétraitement au PMA des *Legionella* d'un échantillon d'eau, applicable directement sur membranes de filtration, ne permettant que la quantification des *Legionella* viables par PCR. Et évaluer la méthode sur des échantillons contenant des quantités contrôlées de *L. pneumophila* dans différents états physiologiques en présence ou non de flore interférente.

Méthodes : Des échantillons d'eau artificiellement contaminés par des bactéries (légionelles ou flore interférente) viables (cultivable et/ou VBNC) ou tuées par la chaleur ont été utilisés pour définir les conditions optimales de prétraitement au PMA directement sur filtre. Le caractère cultivable des légionelles était vérifié par croissance sur BCYE, la viabilité par un marquage à la 5(6)-cFDA contre-coloré par du Syto 61 et révélé en cytométrie de flux. Tous les échantillons ont été quantifiés en utilisant la trousse iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* Kits (Bio-Rad).

Résultats : Le prétraitement optimal au PMA des échantillons implique 2 séries de 1 incubation de 5 minutes avec 6,25µM de PMA à l'obscurité suivie de

5 minutes d'exposition à la lumière sur glace. L'effet inhibiteur du prétraitement sur la quantification des *Legionella* était de $-0,23 \log \pm 0,08$ sur les *Legionella* viables et de $-3,86 \log \pm 0,29$ sur les *Legionella* mortes. Une bonne corrélation est obtenue entre les valeurs de *L. pneumophila* viables obtenue en PMA-qPCR et ceux obtenus à partir du test de viabilité, y compris dans les échantillons ne contenant que des VBNC jusqu'à une concentration de 10^7 bactéries/ml. Une surestimation des *L. pneumophila* viables apparaît pour une concentration de 10^8 bactéries mortes/mL (*L. pneumophila* ou flore interférente).

Conclusion : Dans des conditions contrôlées de laboratoire, le prétraitement au PMA appliqué directement sur membranes de filtration suivi d'une PCR en temps réel permet une quantification rapide des *L. pneumophila* viables (cultivable et VBNC) excepté dans les échantillons avec une charge élevée en bactéries mortes.

Mots clés : Ethidium monoazide, propidium monoazide, *Legionella*, viabilité, quantification, eau.

Prévention des risques liés à l'eau dans les établissements de santé de la Réunion.

P20

J.-C. Denys

ARS, Délégation de La Réunion, 2 bis, av Georges Brassens - CS 60050 97408 Saint-Denis Cedex 09, France
jean-claude.denys@ars.sante.fr

Le risque de dégradation bactérienne de la qualité de l'eau dans les réseaux de distribution intérieure constitue un facteur d'infections nosocomiales pour les établissements de soins. Aussi l'Agence de Santé Océan Indien a-t-elle engagé un programme d'actions pluri-annuel, consistant notamment à réaliser des inspections-diagnostic des établissements, incluant des prélèvements pour contrôles analytiques.

Les campagnes effectuées entre 2008 et 2011 ont permis de détecter la présence de *Legionella pneumophila* pour 15% des prélèvements, avec dépassement du seuil d'alerte-action (103 UFC/l) dans un quart des établissements. Les investigations, élargies au contrôle de la qualité des réseaux d'eau froide, ont détecté la présence de *Pseudomonas aeruginosa* pour plus du tiers des prélèvements ; démontrant que les réseaux d'eau froide, notamment les parties terminales, constituent un réel vecteur de contamination.

Pour renforcer la procédure d'expertise de terrain et faciliter l'identification des points critiques, où l'eau s'est dégradée de façon significative, avec un effet de stagnation ou de biofilm prononcé, l'ARS-OI a testé un outil de mesure in situ de la biomasse active par ATP-métrie quantitative.

Au cours de cette étude, la méthode s'est avérée constituer une adaptation intéressante des capacités de détection, de diagnostic et de surveillance pour gérer le risque de dégradation de la qualité de l'eau. S'agissant d'un indicateur biologique instantané renseignant sur le taux de micro-organismes, l'ATP-métrie, en autorisant une investigation plus exhaustive, permet de guider et d'optimiser les prélèvements pour analyses bactériologiques normalisées, qu'il convient

de réaliser de façon ciblée et périodique, pour qualifier la biomasse détectée.

Le présent travail illustre la nécessité pour les établissements de soins de poursuivre la démarche de prévention engagée :

d'une part, sur les règles de conception des réseaux de distribution d'eau intérieur, de manière à privilégier le bon fonctionnement hydraulique- pour assurer des vitesses suffisantes de circulation de l'eau en tout point des réseaux - ainsi que la maîtrise des températures pour les réseaux d'eau chaude sanitaire. Ce qui implique de faire procéder à des diagnostics-expertises pour guider les travaux de remise en état des équipements. existants, ou d'intégrer ces objectifs de sécurité sanitaire dans les projets de construction ;

d'autre part, sur l'établissement de protocoles d'entretien préventif et curatif du réseau, ainsi que de programmes de surveillance des installations.

Mots-clé : eau chaude sanitaire, légionelles, dégradation bactérienne, *Pseudomonas*, établissements de soins, ATP-métrie quantitative, biomasse active.

Micriamoeba : A new taxon of free-living small-sized amoebae non-permissive to virulent *Legionellae*.

P21

Danièle ATLAN¹, Bénédicte COUPAT-GOUTALAND², Arnaud RISLER^{1,2}, Monique REYROLLE³, Jérôme BRIOLAY⁴, Maud SOUCHON², Sophie JARRAUD^{3,5}, Patricia DOUBLET¹ and Michel PÉLANDAKIS^{1,2}

¹ Université de Lyon, CNRS UMR 5240, Université Lyon1 F-69622 Villeurbanne, France

² Université Lyon 1, Faculté de Pharmacie, Lyon Cedex 08 F-69373, France

³ Centre de Biologie et Pathologie Est, Centre National de Référence des Légionelles, Bron F-69677, France

⁴ Université Lyon 1, DTAMB, IFR41, Villeurbanne, F-69622, France

⁵ Université Lyon, INSERM U851, Université Lyon 1, Lyon F-69008, France

Investigation of soil amoebae of eleven cooling towers, allowed us to isolate a major unknown small-sized amoeba population (SZA). However SZA did not appear specific of cooling tower ecosystems since they also constitute the major amoeba population of muds isolated from different points of a water treatment plant. The SSU-rDNA sequences from SZA strains did not match any known sequences in database which suggests that SZA constitute at least a new amoebal taxon, that we named *Micriamoeba*. The phylogenetic analyses showed that *Micriamoeba* was placed in the Amebozoa group and branched together with *Echinamoeba* genus + *Hartmannella vermiformis*. The phylogenetic analyses within the *Micriamoeba* group distinguish different sub-groups of *Micriamoeba* strains according to their origin, cooling towers or muds.

Although *Micriamoeba* are able to feed with viable *E. coli* cells, they do not uptake virulent *L. pneumophila* strains which allowed them to escape to *Legionella* infection. As a consequence, *Micriamoeba* are not directly involved in *L. pneumophila* multiplication. However, an indirect role of *Micriamoeba* in the *Legionella* risk was discussed.

Legionella pneumophila encodes a specific arylamine N-acetyltransferase (NAT) probably involved in detoxification of aromatic amine chemicals.

P22

X. KUBIAK¹, **D. DERVINS-RAVAULT**², **J. DAIROU**¹, **F. BUSI**¹, **Jean-Marie DUPRET**¹, **C. BUCHRIESER**² and **F. RODRIGUES-LIMA**¹

¹ Univ Paris Diderot-Paris 7, Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA) - CNRS EAC 4413, Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, Paris, France

² Institut Pasteur, Biologie des Bactéries Intracellulaires, 28, Rue du Dr. Roux, Paris France

Arylamine N-acetyltransferases (NATs) are a family of enzymes found in eukaryotes and prokaryotes. They are cytosolic conjugating enzymes, which transfer an acetyl group from acetylCoenzyme A to a xenobiotic acceptor substrate. The precise endogenous function of NAT remains unknown. However, in mycobacteria it was shown to be required for cell wall biosynthesis, survival within macrophages and that the NAT enzyme metabolises inactivation of the anti mycobacterial drug isoniazid. Genome analysis has identified a NAT homologue in *Legionella pneumophila*. We have investigated the activity of the *L. pneumophila* NAT homologue on 21 prototypic NAT substrats and show that it is indeed active for most of them. Interestingly the three isoforms encoded by *L. pneumophila* Lens, Paris and Philadelphia show different specificities. A mutant in the NAT encoding gene loses these specific activities, however there is no significant impact on intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* detectable. Studies to identify the substrate of NAT and its possible role in cell wall biosynthesis like in Mycobacteria are under way.

Liste des participants

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
1	ADER Florence	MCU-PH	INSERM U851 - FINOVI 321 Avenue Jean Jaures 69007 LYON	florence.ader@chu-lyon.fr	04 72 07 15 60
2	ALLAIRE Philippe	Délégué Technico Commercial	Oxoid & Remel Thermofisher Scientific, 6 route de Paisy-BP 13 69571 DARDILLY Cedex	philippe.allaire@thermofisher.com	04 72 52 33 70
3	ALLARD Fabien	Ingénieur Technico Commercial	ALERE 21 , rue Albert Calmette Bât B4 78350 JOUY-EN-JOSAS	Fabien.Allard@alere.com	01 39 46 83 18
4	ALLEGRA Séverine	Enseignante-Chercheur	IUT GBGE 28 avenue Léon Jouhaux 42023 SAINT ETIENNE Cedex 2	severine.allegra@univ-st-etienne.fr	06 75 70 88 15 04 77 46 33 41
5	ALLOMBERT Julie	Thésarde	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	julie.allobert@etu.univ-lyon1.fr	04 72 43 19 71
6	ANDREVIE Sophie	Technicien sanitaire	DT46 de l'ARS Midi Pyrénées 304 rue Victor Hugo 46000 CAHORS	sophie.andrevie@ars.sante.fr	05 81 62 56 27
7	ATLAN Danièle	CR CNRS	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	daniel.atlan@univ-lyon1.fr	04 72 43 19 71
8	BADIOU Cédric	Technicien	Bactériologie, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin 69372 LYON	cedric.badiou@univ-lyon1.fr	06 88 67 36 24
9	BAILLEUX Clarisse	Technicien sanitaire	ARS Rhône Alpes 129 rue Servient 69418 LYON Cedex03	clarisse.bailleux@ars.sante.fr	04 72 34 74 38
10	BAILO Nathalie	Technicienne	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	nathalie.bailo@univ-lyon1.fr	04 72 43 19 71
11	BARAILLER Josiane	Chef de produits	bioMérieux 69280 MARCY-L'ETOILE	josiane.barailler@biomerieux.com	06 10 48 48 14
12	BARBAROSA Sheila	Etudiante Master	Instituto Cantonale di Microbiologia-Via Miarasole 22A 6500 BELLINZONA (Suisse)	sheila.barbarosa@ti.ch	00 41 91 8146011
13	BAUME Maud	Ingénieur	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	maud.baume@chu-lyon.fr	04 72 15 52 58
14	BEAUTE Julien	ECDC	ECDC 171 83 STOCKHOLM	Julien.Beaute@ecdc.europa.eu	00 46 (0) 8 58 60 14 65
15	BENITO Yvonne	Ingénieur HCL	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	yvonne.benito@chu-lyon.fr	04 72 38 13 24
16	BERGUE Elisabeth	Cadre de Santé Hygiéniste	Unité d'Hygiène et d'Epidémiologie du GHE	elisabeth.bergue@chu-lyon.fr	04 72 68 49 28
17	BERJEAUD Jean Marc	Maître de Conférences	Microbiologie de l'eau UMR6008 1 rue Georges Bonnet 86022 POITIERS	jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 06
18	BERNARD Claire	Interne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	claire.bernard@gmail.com	06 99 67 15 94
19	BERNHARD Odile	Technicienne	Laboratoire Hygiène Ville de PARIS	odile.bernhard@paris.fr	01 39 75 19 02
20	BES Michèle	Biologiste	CNR staphylocoques, CBE 59 Bld Pinel 69500 BRON	michele.bes@chu-lyon.fr	04 72 12 96 62
21	BIARDEAU Jean Bernard	Technicien Sanitaire	ARS-DT18 BOURGES	jean-bernard.biardeau@ars.sante.fr	02 38 77 33 23
22	BIGOT Renaud	Doctorant	UMR CNRS 6008 Université de POITIERS, IBMIG-PBS	renaud.bigot@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 13
23	BINET Marie	Ingénieur Chercheur	EDF R et D, 6 quai Watier 78400 CHATOU	marie.binet@edf.fr	
24	BOISSETSandrine	Biologiste-Chercheur	INSERM U851, Bactériologie Laboratoire de Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69500 BRON	sandrine.boisset@univ-lyon1.fr	04 72 15 52 57
25	BON Brigitte	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	brigitte.bon@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
26	BORGEY Christelle	Technicien sanitaire	ARS DT38 17-19 Commandant l'Herminier 38032 GRENOBLE Cedex	christelle.borgey@ars.sante.fr	04 76 63 65 42
27	BOSQUET Alain	Ingénieur Ventes	PALL medical 3 rue des Gaudines BP90234 78102 SAINT GERMAIN EN LAYE	alin_bosquet@europe.pall.com	06 85 91 74 69
28	BOUSSEAU ANNE	PH Hygiéniste	CHU 2 rue de la Milétrie, 86021 POITIERS Cedex	a.bousseau@chu-poitiers.fr	05 49 44 32 92
29	BOUTELEUX Céline	Ingénieur Chercheur	EDF R et D 6 quai Watier 78400 CHATOU	celine.bouteleux@edf.fr	
30	BOUZIGES Nicole	Praticien Hospitalier	Laboratoire de Bactériologie CHU NIMES	nicole.bouziges@chu-nimes.fr	04 66 68 31 02
31	BRIAND Hélène	Responsable Service R et D	bioMérieux 69280 MARCY-L'ETOILE	helene.briand@biomerieux.com	04 78 87 54 56
32	BRUNEL-FORESTIER Delphine	Ingénieur	La Drôme Laboratoires 37 avenue de Lautagne 26000 VALENCE	dbrunel-forestier@ladrome.fr	04.75.81.70.70
33	BRUNO Audrey	Ingénieur études sanitaire	3 rue des Lilas 75019 PARIS	audrey.bruno@ars.sante.fr	01 44 02 07 16
34	BUCHRIESER Carmen	Directeur recherche	Institut Pasteur 28 rue du Dr. Roux 75724 PARIS Cedex 15	cbuch@pasteur.fr	01 45 68 83 72

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
35	BUGEJA Mark	Responsable Qualité	SOLUBIO 1 rue de l'Ardèche 44800 SAINT HERBLAIN	m.bugeja@solubio.com	02 40 46 35 34
36	CADIERE Axelle	Ingénieur Recherche	EHESP Place Gabriel Péri 30000 NIMES	axelle.cadiera@ehesp	04 66 27 95 85
37	CADOUX Jean Stéphane	Responsable Qualité et développement durable	Carrefour	jean_stephane_cadoux@carrefour.com	06 85 91 80 75
38	CALVO Marylin	Chef de Service	LDA 13 Technopole de Château Gombert 13013 MARSEILLE	marilyne.calvo@cg13.fr	04 13 31 90 12
39	CAMIN-RAVENNE Anne Marie	Médecin Biologiste PH	Laboratoire CH de Bigorre 65000 TARBES	am.ravenne@orange.fr	05 62 54 61 92
40	CAMPESE Christine	Epidémiologiste	INVS 14 rue du Val d'Osne 94415 SAINT MAURICE Cedex France	c.campease@invs.sante.fr	01 41 79 67 72
41	CARLIER Damien	Ingénieur	Laboratoire Hygiène Ville de Paris	damien.carlier@paris.fr	01 44 97 87 87
42	CASATI Simona	Co-responsable CNR LEGIONELLA	Instituto Cantonale di Microbiologia-Via Miarasole 22A 6500 BELLINZONA (Suisse)	simona.casati@ti.ch	00 41 91 8146011
43	CASSIER Pierre	AHU	Laboratoire d'Hygiène Hospitalière GH E. Herriot 69003 LYON	pierre.cassier@chu-lyon.fr	04 72 11 07 21
44	CHAABNA Zinedine	Doctorant	UMR CARTEL Université de Savoie 73376 LE BOURGET DU LAC	zineddine.chaabna@univ-savoie.fr	06 33 13 40 30
45	CHAFTAR Nawel	Doctorante	UMR CNRS 6008 Université de Poitiers, IBMIG-PBS	jacques.frere@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 13
46	CHALLEMEL Olivier	Technicien	Laboratoire Hygiène Ville de Paris	olivier.challemel@paris.fr	01 44 97 88 14
47	CHAPERON Gilles	Directeur technique	CAPSIS 1 rue de terre Neuve 91940 LES ULIS	gilles.chaperon@capsis.fr	01 69 28 29 67
48	CHARPENTIER Xavier	Chercheur	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	x.charpentier@free.fr	04 72 43 19 71
49	CHASSAGNE Isabelle	Technicienne	Laboratoire Hygiène CHU LIMOGES	isabelle.chassagne@chu-limoges	05 55 05 68 31
50	CHASTANG Joelle	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	joelle.chastang@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
51	CHATELAIN Rémi	Biologiste	Laboratoire Biologie Médicale 3-5, petite rue des tanneries 42334 ROANNE	r.chatelain@lbmroanne.com	04 77 23 94 60
52	CHE Didier	Médecin Epidémiologiste	Unité Infections respiratoires et pathologies émergentes INVS 14 rue du Val d'Osne 94415 SAINT MAURICE	d.che@invs.sante.fr	01 41 79 67 30
53	CHEFSON GIRAULT Christine	PH-Hygiène	CHU ROUEN	christine.chefson-girault@chu-rouen.fr	02 32 88 86 32
54	COISNE Stéphane	Directeur Ventes et Marketing	ALERE 21 , rue Albert Calmette Bât B4 78350 JOUY-EN-JOSAS	stephane.coisne@alere.com	01 39 46 83 18
55	COMTE Audrey	technicien sanitaire	ARS Délé de L'Ain, 4 bld Voltaire 01012 BOURG EN BRESSE	audrey.comte@ars.sante.fr	04 74 32 80 72
56	COQUILLET Sylvie	Responsable Pôle Bactériologie	Laboratoire CAE 17 rue du doyen Denis LEROY CS74401 35044 RENNES Cedex	sylvie.coquillet@veolia.com	02 99 33 57 07
57	COSCOLLA Mireia	PhD	Tuberculosis Research Unit Swiss Tropical and Public Health Institute Socinstrasse 57 4002 Basel	mireia.coscolla@unibas.ch	+41(0) 6 12 84 83 68
58	COUDRAIS Stéphanie	Technicienne Biohygiéniste	GH SUD 69485 PIERRE BENITE	stephanie.coudrais@chu-lyon.fr	04 78 86 12 68
59	COULIBALY Kalpy Julien	Médecin Biologiste	Institut Pasteur COTE D'IVOIRE ABIDJAN	jc_kalpy@yahoo.fr	225 07 91 51 76
60	COULIBALY N'GOLO DAVID	Attaché Recherche	Institut Pasteur COTE D'IVOIRE ABIDJAN	david79tr@yahoo.fr	225 07 91 51 76
61	COURTOIS Sophie	Ingénieur Projets	SUEZ ENVIRONNEMENT 38 rue Président Wilson 78230 LE PECO	sophie.courtois@suez-env.com	01 34 80 22 28
62	COUTAUD Bernard	Directeur Commercial	PALL medical 3 rue des Gaudines BP90234 78102 SAINT GERMAIN EN LAYE	bernard_coutaud@europe.pall.com	06 08 25 54 09
63	DAUWALDER Olivier	Biologiste	INSERM U851, Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	olivier.dauwalder@chu-lyon.fr	04 72 12 96 69
64	DEJEAN Gisèle	Ingénieur Principal d'Etudes Sanitaires	DT33 de l'ARS Aquitaine 103bis rue Belleville 33063 BORDEAUX	gisele.dejean@ars.sante.fr	05 57 01 45 54
65	DELOM Eric	Superviseur Microbiologie	CTC environnement 4, rue Hermann Frenkel - 69367 LYON Cedex 07	edelom@ctcgrupe.com	04 72 76 10 05
66	DELPRATO Sara	Chef de produits	ORGENTEC 4 rue Edouard Branly 78190 TRAPPES	sdelprato@orgentec.fr	01 30 68 80 00
67	DEROUIN Véronique	Equipe Opérationnelle Hygiène	8 rue Odéon 75006 PARIS	veronique.drouin@gmail.com	06 48 55 21 53

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
68	DERVINS-RAVAULT Delphine	Technicienne	Institut Pasteur 28 rue du Dr. Roux 75724 PARIS Cedex 15	dravault@pasteur.fr	01 41 15 11 40
69	DESAUBIAUX Bénédicte	IDESP	ARS Pays de Loire 44262 NANTES	benedicte.desaubiaux@ars.sante.fr	02 49 10 42 10
70	DESBONNES Chantal	Technicienne Microbiologie des Eaux	Laboratoire Départemental Franck Duncombe 14053 CAEN	chantal.desbonnes@calvados.fr	02 31 47 19 19
71	DESBOS Agnès	Cadre de Santé	Bactériologie Laboratoire de Microbiologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	agnes.desbos@chu-lyon.fr	04 72 12 96 51
72	DESCOURS Ghislaine	Biologiste	CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	ghislaine.descours@chu-lyon.fr	04 72 12 96 64
73	DOLEANS JORDHEIM Anne	Biologiste	Bactériologie Laboratoire de Microbiologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	anne.doleans-jordheim@chu-lyon.fr	04 72 12 96 68
74	DOUBLET Patricia	PU	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	patricia.doulet@univ-lyon1.fr	04 72 43 19 71
75	DROGUET Jérôme	Ingénieur	D.A.T. 49 rue Villon 69008 LYON	jerome.droguet@chu-lyon.fr	04 72 11 70 66
76	DROICOURT Karine	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	karine.droicourt@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
77	DUBOST Charles	Président Thétis Environnement	Z I de Mont Bertrand 8 rue du Claret 38230 CHARVIEU	charles.dubost@thetis-environnement.com	04 78 32 42 00
78	DUGOUR Laurent	Technicien	Laboratoire départemental d'analyses et de recherche 100 rue de l'égalité 15013 AURILLAC	ldugourd@cg15.fr	04 71 45 58 80
79	DUMAS Marie-Yvonne	Directeur Général	Oxoid & Remel Thermofisher Scientific 6 route de Paisy-BP 13 69571 DARDILLYCedex	marie-christine.dumas@thermofisher.com	04 72 52 33 70
80	DUPIY Matthieu	Doctorant	EDF R et D, 6 quai Watier 78400 CHATOU	matthieu.dupuy@edf.fr	
81	DURAND Géraldine	Pharm. D. Ph.D., R&D Microbiology	bioMérieux 3 route de Port Michaud, La Balme Les Grottes, 38390 France	Geraldine.DURAND@biomerieux.com	04 74 95 26 51
82	ESTEVE-MOUSSION Isabelle	Ingénieur Sanitaire	ARS Languedoc Roussillon 28 parc club du Millénaire 34067 MONTPELLIER Cedex 2	isabelle.esteve-moussion@ars.sante.fr	04 67 07 21 79
83	ETIENNE Jérôme	PU-PH directeur CNR légionelles	CNR légionelles, CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	jerome.etienne@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 72
84	FACON Jean-Pierre	expert scientifique	Route de Cassel 59114 STEENVOORDE	jean-pierre.facon@bio-rad.com	
85	FICHET Armelle	Technicienne Microbiologie des Eaux	Laboratoire Départemental Franck Duncombe 14053 CAEN	chantal.desbonnes@calvados.fr	02 31 47 19 19
86	FONTVIELLE Dominique	PR-1	UMR CARRTEL Université de Savoie 73376 LE BOURGET DU LAC	dfont@univ-savoie.fr	04 79 75 88 63
87	FOREY Françoise	Biologiste	CNR légionelles	francoise.forey@chu-lyon.fr	04 72 12 96 63
88	FRANKE Florian	Epidémiologiste	LIRE PACA ARS PACA 132 bld deParis CS500039 13331 MARSEILLE Cedex 03	florian.franke@ars.sante.fr	04 13 55 83 19
89	FRAYSSINES Jocelyne	gérante	ARIONIC 4 Bld Bellerive BP238 95204 RUEIL MALMAISON	info@arionic.com	01 41 42 36 81
90	FRENEY Jean	PU-PH	Laboratoire de Microbiologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	jean.freney@chu-lyon.fr	04 72 12 96 71
91	FRERE Jacques	Professeur Universités	dir UMR CNRS 6008 Université de Poitiers, IBMIG-PBS	jacques.frere@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 13
92	FUCHE Fabien	Thésard	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	fabien.fuche@etu.univ-lyon1.fr	04 72 43 19 71
93	FUHRMANN Christine	Biologiste	Laboratoire de Microbiologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	christine.fuhrmann@chu-lyon.fr	04 72 15 52 59
94	GAGNAIRE Julie	Interne Pharmacie	UHE-HEH 5 place d'Arsonval 69437 LYON Cedex 03	gagnaire.julie@gmail.com	04 72 11 07 19
95	GAIA Valeria	Responsable CNR LEGIONELLA	Instituto Cantonale di Microbiologia-Via Mirasole 22A 6500 BELLINZONA (Suisse)	valeria.gaia@ti.ch	00 41 91 8146018
96	GAILLARD Stéphanie	Technicienne	LDA39-59 rue du Vieil Hôpital BP40135 39802 POLIGNY Cedex	sgaillard@cg39.fr	03 84 73 73 40
97	GAUDINAT Guillaume	Technicien sanitaire	Cité Admin Bat C BP587 Bld G Sand 36019 CHATEAUROUX	guillaume.gaudinat@ars.sante.fr	02 38 77 33 90
98	GEISSMANN Tom	CR1 INSERM U851	Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin 69372 LYON	tom.geissmann@inserm.fr	04 78 77 86 57
99	GICQUEL Claude	Responsable Secteur	GIRPI rue Robert AnceI 76700 HARFLEUR	cgicquel@girpi.fr	06 07 53 96 20

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
100	GILARDOT Daniel	Technicien Sanitaire	ARS-POITOU CHARENTES POITIERS	daniel.gilardot@ars.sante.fr	05 49 44 83 15
101	GILBERT Christophe	MCU	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	christophe.gilbert@univ-lyon1.fr	04 72 43 19 71
102	GINEVRA Christophe	Post Doctorant	CNR légionelles, INSERM U851 69008 LYON	christophe.ginevra@univ-lyon1.fr	04 78 77 86 42
103	GIRARD Raphaelae	PH Unité d'Hygiène et Epidémiologie	GH SUD 69485 PIERRE BENITE	raphaele.girard@chu-lyon.fr	04 78 86 12 73
104	GIRARDO Pascale	Biologiste	Laboratoire de Microbiologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	pascale.girardo@chu-lyon.fr	04 72 12 70
105	GIRON Sandra	Epidémiologiste	CIRE Auvergne, 60 avenue de l'Union Soviétique 63057 CLERMONT-FERRAND	sandra.giron@ars.sante.fr	04 73 74 50 37
106	GOMEZ VALERO Laura	Post Doctorante	Institut Pasteur 28 rue du Dr. Roux 75724 PARIS Cedex 15	lgomez@pasteur.fr	01 41 15 11 40
107	GREUB Gilbert	MD PhD	Institute of Microbiology University of Lausanne 1011 LAUSANNE Suisse	gilbert.greub@chuv.ch	0041 21 314 49 79
108	GSTALDER Marie-Eve	Ingénieur recherche	CYLERGIE Centre de Recherche de COFELY 69130 ECULLY	marie-eve.gstalter@cofely-gdfsuez.com	04 72 86 09 31
109	GUILLARD Chantal	DR2	IRCE LYON 2 avenue Albert Einstein 69626 VILLEURBANNE	chantal.guillard@ircelyon.univ-lyon1.fr	04 72 44 53 16
110	GUILLAUME Carole	Ingénieur de Recherche	EDF R et D 6 quai Watier 78400 CHATOU	carole-externe.guillaume@edf.fr	01 30 87 75 55
111	GUYARD Cyril	Assistant professor University of Toronto	81 Resources road M9P 3T1 TORONTO, CANADA	cyril.guyard@oahpp.ca	001 416 427 9060
112	HECHARD Yann	Professeur Universités	UMR CNRS 6008 Université de Poitiers, IBMIG-PBS	yann.hechard@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 07
113	JACOTIN Nathalie	technicienne	CNR légionelles, CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	nathaliejac@free.fr	04 72 12 96 23
114	JAKUBEK Delphine	Thésarde	EDF R et D 6 quai Watier 78400 CHATOU	delphine.jakubek@edf.fr	01 30 87 75 19
115	JAMILLOUX Yvan	Master 2	INSERM U851 - FINOVI 321 Avenue Jean Jaures 69007 LYON	yvan.jamilloux@inserm.fr	04 37 26 29 82
116	JARRAUD Sophie	MCU-PH codirectrice CNR légionelles	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON, INSERM U851	sophie.jarraud@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 65
117	JUAN Pierre-Alexandre	Etudiant Master	Bactériologie, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin 69372 LYON	pierrealexandrejuan@hotmail.com	04 78 77 86 57
118	KAY Elisabeth	CR-CNRS	UMR5163 38042 GRENOBLE	elisabeth.kay@ujf-grenoble.fr	06 74 34 81 49
119	KIRCHHOFFER Matthieu	Expert Traitement d'eau	COFELY Tour Voltaire 92059 PARIS La Défense	matthieu.kirchhoffer@cofely-gdfsuez.com, tania.aleksic@cofely-gdfsuez.com	06 69 29 36 82
120	KOUASSI Haouley Marc Tanguy	Etudiant	Institut Pasteur COTE D'IVOIRE ABIDJAN	haouley@yahoo.fr	225 09 30 51 16
121	KROUK Mounira	Technicienne	ARS PACA 32 avenue François Béranger 06700 ST LAURENT DU VAR	Mounira.KROUK@ars.sante.fr	04 13 55 87 36
122	LABROSSE Aurélie	Responsable Laboratoire	Thermes d'Aix Les Bains Groupe Valvital 10 route du Revard 73013 AIX LES BAINS	aurelie.labrosse@valvital.fr	04 79 35 57 70
123	LAURENT Frédéric	Biologiste PH	INSERM U851, Université LYON I	frederic.laurent@univ-lyon1.fr	04 72 07 18 39
124	LAYS Claire	Doctorante	Bactériologie, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin 69372 LYON	claire.lays@inserm.fr	04 78 77 86 57
125	LE BIHAN Yann	Chef de Produit	Oxoid & Remel Thermofisher Scientific 6 route de Paisy-BP 13 69571 DARDILLYCedex	yann.lebihan@thermofischer.com	04 72 52 33 70
126	LE CANN Pierre	Enseignant-Chercheur	Dpt Santé Envirt Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique 35043 RENNES	pierre.lecann@ehesp.fr	02 99 02 26 81
127	LE GALLIARD Valérie	Cadre de Santé Publique	ARS/CVAGS 30 rue Thiers 79000 NIORT	valerie-legaillard@ars.sante.fr	05 49 06 70 23
128	LEPELTIER Sabrina	Ingénieur Génie Sanitaire	ARS Centre 131 rue du Faubourg Bannier BP74409 45044 ORLEANS Cedex	sabrina.lepelletier@ars.sante.fr	02 38 77 47 58
129	LINA Gérard	PU-PH	CNR légionelles, INSERM U851 69008 LYON	gerard.lina@univ-lyon1.fr	04 72 1296 67
130	LOPEZ Dominique	Technicienne Chef	ARS-DT18 BOURGES	dominique.lopez@ars.sante.fr	02 38 77 33 19
131	LUCHIER Didier	Ingénieur	20 ch Louis Chirpaz 69130 ECULLY	d.luchier@gmail.com	08 18 65 80 05
132	MARQUET Marie-Françoise	Chef de Produits	Oxoid & Remel Thermofisher Scientific 6 route de Paisy-BP 13 69571 DARDILLYCedex	marie-francois.marquet@thermofisher.com	04 72 52 33 70

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
133	MARSAC Audrey	Chef de produits	bioMérieux 69280 MARCY-L'ETOILE	audrey.marsac@biomerieux.com	04 78 87 70 95
134	MARTIN Emilie	Interne	Bactériologie, CH LYON SUD	emilie.martin@chu-lyon.fr	06 79 98 02 87
135	MARTY Nicole	PU-PH	Bactériologie IFB CHU Purpan 31059 TOULOUSE	marty.n@chu-toulouse.fr	05 67 69 04 07
136	MAURICE-BLANC Cécile	Doctorante	UMR CARRTEL Université de Savoie 73376 LE BOURGET DU LAC	cecile.maurice-blanc@univ-savoie.fr	04 79 75 86 07
137	MAURIN Max	PU-PH	Laboratoire de Bactériologie CHU GRENOBLE 38043	mmaurin@chu-grenoble.fr	04 76 76 54 79
138	MEHIRI Emna	Biologiste Pharmacienne	27 rue Arbi Kabadi El Omrana 1005 TUNIS TUNISIE	emna.mehiri@tunet.tn	002169 8426416
139	MERCHAT Michèle	Responsable Recherche technique air et eau	CLIMESPACE 3 rue de Turbigo 75001 PARIS	michele.merchat@climespace.fr	06 74 88 27 62
140	MERCIER Claire	Thésarde	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	claire.mercier@biomerieux.com	04 72 43 19 71
141	MEUGNIER Hélène	Ingénieur	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	helene.meugnier@chu-lyon.fr	07 72 12 95 80
142	MICHARD Céline	Etudiante en M2	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	cel.michard@orange.fr	04 72 43 19 71
143	MICHON Laurent	Responsable du pôle Santé	CARSO-LSEHL 31 avenue Jean Jaurès 69007 LYON	lmichon@groupecarso.fr	04 72 76 16 16
144	MORDELET Pauline	Ingénieur D'Etudes Sanitaires	ARS DT94 38-40 rue Saint Simon 94000 CRETEIL	pauline.mordelet@ars.sante.fr	01 49 81 87 81
145	MOREL Evelyne	IDR santé publique	4 Bld Voltaire 011000 BOURG EN BRESSE	evelyne.morel@ars.sante.fr	04 74 32 80 76
146	MORET Dominique	Technicien	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	dominique.moret@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
147	MOUSCADET Jean-François	Directeur R et D	BIORAD laboratories 3 Boulevard Raymond Poincaré, 92430 MARNES LA COQUETTE	jean-francois.mouscadedet@bio-rad.com	01 47 95 80 51
148	NDAYOWOUAFO Marguerite	Chef de Service	Laboratoire d'Hygiène Centre Pasteur Rp1274 YAOUNDE CAMEROUN	mndayo@yahoo.com	23777477362
149	NICOLLE Marie Christine	PH	GH E Herriot 69437 LYON Cedex 03	marie-christine.nicolle@chu-lyon.fr	04 72 11 07 21
150	NOUVELLON Michèle	PH biologiste	CHU 1 rue de Germont 76031 ROUEN	michele.nouvelon@chu-rouen.fr	02 32 88 86 32
151	OGER-DUROY Cécile	Chef produit International	BIORAD laboratories 3 Boulevard Raymond Poincaré, 92430 MARNES LA COQUETTE	Cecile.Oger-Duroy@bio-rad.com	01 47 95 81 74
152	PAMIES Sophie	Médecin Directeur DSP	52 rue Racine 69601 VILLEURBANNE Cedex	sophie.pamies@mairie-villeurbanne.fr	04 78 03 69 17
153	PANETIER Pascale	chef unite evaluation risques liés à l'eau	ANSES 27-31 avenue du Général Leclerc 94701 MAISONS -ALFORT Cedex	pascale.panetier@anses.fr	01 49 77 38 02
154	PARIS Patrick	Président Association	CAPRIS 149 avenue du Maine 75014 PARIS	infos@capris.asso.fr	01 45 45 25 38
155	PAVAGEAU Yannick	Ingénieur Direction générale de la santé	bureau EA4 Ministère du travail, de l'emploi et de la santé14, avenue Duquesne - F-75350 PARIS 07	Yannick.PAVAGEAU@sante.gouv.fr	01 40 56 74 43
156	PECASTAINGS Sophie	Post Doctorant	Université Paul Sabatier, Laboratoire de Génie Chimique, dép. Biosym 35 chemin des Maraîchers 31062 TOULOUSE Cedex 09	sophie@pecastaings.net	05 62 25 68 60
157	PELOUX-PETIOT Françoise	Médecin ARS PACA	ARS PACA 32 avenue François Béranger 06700 ST LAURENT DU VAR	francoise.peloux-petiot@ars.sante.fr	04 13 55 87 56
158	PEROUSE DE MONTCLOS	Praticien Hospitalier	Bactériologie, CH LYON SUD	michele.perouse-de-montclos@chu-lyon.fr	04 78 86 12 35
159	PESTOURIE Nathalie	Assistant Spécialiste	Laboratoire Hygiène CHU LIMOGES	nathalie.pestourie@chu-limoges.fr	05 55 05 68 31
160	PHILIPPE Cécile	Responsable scientifique	PALL medical 3 rue des Gaudines BP90234 78102 SAINT GERMAIN EN LAYE	cecile_philippe@europe.pall.com	06 08 26 12 53
161	PIGEOT-REMY Stéphanie	Thésarde	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	s.pigeot.remy@gmail.com	04 72 43 19 71
162	PINON Anthony	Chargé d'Etude	Institut Pasteur de Lille 1 rue du Pr Calmette BP245 59019 LILLE	anthony.pinon@pasteur-lille.fr	03 20 87 72 63
163	PLASSON fabrice	PDG Société AMOEBIA	AMOEBIA 60 avenue Rockefeller Bat laennec 69008 LYON	fabrice.plasson@amoeba-biocide.com	04 26 69 16 00
164	PLEZ Philippe	Ingénieur Technico Commercial	ALERE 21 , rue Albert Calmette Bât B4 78350 JOUY-EN-JOSAS	Philippe.Plez@alere.com	01 39 46 83 18
165	PLOTON Christine	Biologiste	CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	christine.ploton@chu-lyon.fr	04 72 12 96 60

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
166	POIRIER Rémi	Chef de projets ANSES	Unité eau -agents biologiques 27 - 31 Avenue du Général Leclerc 94701 MAISONS-ALFORT Cedex	remi.poirier@anses.fr	01 56 29 15 98
167	PORTIER Emilie	Doctorante	UMR CNRS 6008 Université de Poitiers, IBMIG-PBS	emilie.portier@etu.univ-poitiers.fr	
168	POTIER Alexandre	Responsable technique	GIRPI rue Robert Ancef 76700 HARFLEUR	apotier.girpi@allaxis.com	02 32 79 60 00
169	POURCEL Christine	Chercheur	Université Paris Sud Institut de Génétique et Microbiologie Bat 400 91405 ORSAY Cedex	christine.pourcel@u-psud.fr	01 69 15 30 01
170	RAGUET Sophie	Pharmacienne-Epidémiologiste	ARS Alsace, 14 rue du Maréchal Juin 67084 STRASBOURG	sophie.raguet2@ars.sante.fr	03 88 88 93 19
171	RAOUL Christophe	Ingénieur Sanitaire	ARS Nord-Pas de Calais EURALILLE	christophe.raoul@ars.sante.fr	03 62 72 88 66
172	RASIGADE Jean Philippe	AHU	Bactériologie GH LYON NORD	jean-philippe.rasigade@chu-lyon.fr	07 72 00 37 04
173	RAYMOND Marc	Président aqua-tools	ZAC des Chevries 78410 AUBERGENVILLE	marc.raymond@aqua-tools.com	01 30 95 79 50
174	RAYMOND Pauline	Technicienne sanitaire	ARS Ile de France 94000 CRETEIL	pauline.raymond@ars.sante.fr	01 49 81 87 52
175	REGARD Anne	Biohygiéniste	GH Edouard Herriot 69003 LYON	anne.regard@chu-lyon.fr	04 72 11 07 27
176	REVERDY Marie Elisabeth	Biologiste	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	marie-elisabeth.reverdy@chu-lyon.fr	04 72 12 96 66
177	REYROLLE Monique	Ingénieur	CNR légionelles, CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	monique.reyrolle@chu-lyon.fr	04 72 12 95 81
178	RIFFARD Serge	Professeur Universités	GIMAP EA 3064, Faculté de Médecine 15 rue A Paré 42023 SAINT ETIENNE	serge.riffard@univ-st-etienne.fr	06 07 75 16 62
179	RITTER Philippe	Médecin Directeur	DEU-SCHS 60 rue de Seze 69006 LYON	philippe.ritter@mairie-lyon.fr	04 72 83 14 00
180	ROBERT Stéphane	Attaché Direction Qualité	LACTALIS 10 à 20 rue Adolphe Beck 53089 LAVAL Cedex9	stephane.robert@lactalis.fr	02 43 59 41 45
181	ROCHE Laeticia	Technicienne	Thermes d'Aix Les Bains Groupe Valvital 10 route du Revard 73013 AIX LES BAINS	laeticia.roche@valvital.fr	04 79 35 57 70
182	ROCHELLE Jérôme	Ingénieur Etudes Sanitaires	ARS-DT35 24 rue Antoine Joly 35042 RENNES	jerome.rochelle@ars.sante.fr	02 99 33 34 33
183	ROMARU Annette	Praticien Hygiéniste	CHI de la Haute Saône Service Qualité Gestion des Risques 70014 VESOUL	a.romaru@chi70.fr	03 84 96 67 05
184	ROPIQUET Frédéric	Responsable R et D	Laboratoire BIOQUAL rue henri Fabre 09100 PAMERS	f.ropiquet@laboratoire-bioqual.fr	05 34 01 21 60
185	SALORD Hélène	Biologiste PH	Bactériologie GH LYON NORD	helene.salord@chu-lyon.fr	04 72 07 18 40
186	SASSONE Stéphanie	Technicienne sanitaire	ARS PACA DT13 Immeuble M'square CS50039 13331 MARSEILLE	stephanie.sassone@ars.sante.fr	04 13 55 82 38
187	SAUZET Christophe	Commercial	bioMérieux 69280 MARCY-L'ETOILE	christophe.sauzet@biomerieux.com	06 80 18 77 48
188	SCHUR Cindy	Directeur technique	CARSO-LSEHL 31 avenue Jean Jaurès 69007 LYON	cshur@groupecarso.com	06 10 93 09 59
189	SENSE Martine	Responsable Laboratoire	LDS 72 Bactériologie des Eaux 72018 LE MANS	martine.sense@cg72.fr	02 43 39 95 87
190	SHADOUH Lubana	Thésarde	CHU de GRENOBLE et LAPM	lshadoud@chu-grenoble.fr	04 76 76 54 79
191	SIFFERT Marielle	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	marielle.siffert@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
192	SLIMANI Sami	Responsable Service Microbiologie	Savoie Technolac 23 allée Lac d'Aiguelette 733774 Le BOURGET DU LAC	s.slimani@savoie-labo.fr	04 79 25 37 25
193	SNARSKY Nicolas	Directeur des Ventes aqua-tools	ZAC des Chevries 78410 AUBERGENVILLE	nicolas.snarsky@aqua-tools.com	01 30 95 79 50
194	SOBAS Chantal	Biologiste PH	Bactériologie GH LYON NORD	chantal.sobas@chu-lyon.fr	04 72 07 18 37
195	SOREAU Sylvie	Ingénieur	EDF R et D 6 quai Watier 78400 CHATOU	sylvie.soreau@edf.fr	
196	SPERANDIO Daniel	ATER	UMR 5520 Bat LWOFF 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	sperandiodaniel4@gmail.com	04 72 43 19 71
197	SQUINAZI Fabien	Directeur	Laboratoire Hygiène Ville de Paris	fabien.squinazi@paris.fr	01 44 97 87 87
198	STEINERT Michael	Institut de Microbiologie	Institut de Microbiologie, Technische Universität BRAUNSCHWEIG, Allemagne	m.steinert@tu-bs.de	0049 531 391 5802
199	SUET Auriane	Interne Biologie Médicale	Hospices Civils de LYON	auriane.suet@orange.fr	06 11 96 18 99
200	SUN LAY Kruy	Chef laboratoire	Laboratoire de Microbiologie Alimentaire Institut Pasteur du Cambodge PNOM PENH	ksunlay@pasteur-kh.org	855 23 426009

SympoLegio

Lyon - 15 et 16 novembre 2011

SPONSORS



PARRAINS

