

# SympoLegio

Lyon - 17 et 18 novembre 2015

## *Legionella* de l'environnement à l'homme

17 et 18 novembre 2015

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.**

## Session 1. TRANSMISSION - EPIDEMIOLOGIE

Modérateurs : Valeria GAIA / Sophie JARRAUD

9h35 - 9h50 : **Christine CAMPESE** (InVS, St Maurice). Caractéristiques épidémiologiques des cas de légionellose en 2014 en France et en Europe.

9h50 - 10h10 : **Laetitia BERAUD** (CNR des légionelles, Lyon). Surveillance de la Légionellose en France : retour des enquêtes épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014.

10h10 - 10h30 : **Christine CAMPESE** (InVS, St Maurice). Etude sur l'impact des retombées de panaches émises par les tours aéro-réfrigérantes des centres nucléaires de production électrique d'EDF sur la survenue de cas de légionellose en France de 2010 à 2012.

10h30 - 11h10 : **Sebastian CRESPI** (Palma de Mallorca, Espagne). A convoluted outbreak. Exploring the hidden side of the moon.

■ 11h10 - 11h50 : **PAUSE - SESSION POSTER**

Modérateurs : Christine LAWRENCE / Jean Marc BERJEAUD

11h50 - 12h10 : **Emmanuelle VAISSIERE / Sébastien MAGNE** (CIRE région Auvergne, Clermont-Ferrand). Investigation d'une suspicion de cas groupés de légionellose, Aurillac (Cantal) : exploration des sources d'exposition environnementales.

12h10 - 12h30 : **France WALLET** (Service des Etudes Médicales, EDF, Levallois Perret). Analyse probabiliste des données d'une épidémie de légionelloses : contribution à l'évaluation du risque.

■ 12h30 - 14h30 : **DEJEUNER - SESSION POSTER**

## Session 2. ENVIRONNEMENT

Modérateurs : Christine LAWRENCE / Jean Marc BERJEAUD

14h30 - 14h50 : **Sam DUKAN** (CLICK4TAG, Grand Luminy Technopole, Marseille). Nouvelle méthode rapide de dénombrement semi-quantitatif des *Legionella pneumophila* cultivables.

14h50 - 15h10 : **Séverine ALLEGRA** (UMR 5600 EVS-ISTHME, St Etienne). Caractérisations physiques et physiologiques des aérosols de légionelles atteignant la région thoracique.

#### Session 3. TYPAGE ET GENOMIQUE COMPARATIVE

Modérateurs : Xavier CHARPENTIER / Christophe GINEVRA

15h10 – 15h30 : **Joël F. POTHIER** (Zurich University of Applied Sciences ZHAW, Institute of Natural Resources Sciences, Environmental Genomics and Systems Biology Research Group, Switzerland). Identification and subtyping of *Legionella pneumophila* strains by Whole Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry (WCMS) using PAPMID (Putative Assigned Protein Masses for Identification Database).

15h30 – 16h00 : **Sophia DAVID** (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK). The evaluation of whole genome sequencing for the epidemiological typing of *Legionella pneumophila*.

#### ■ 16h00 - 16h45 : PAUSE - SESSION POSTER

16h45 - 17h15 : **Laura GOMEZ VALERO** (Institut Pasteur, Biologie des bactéries intracellulaire, CNRS UMR 3525, Paris). The *Legionella* genus genome: comparative genomics of the entire bacterial genus.

17h15 - 17h35 : **Ahmad KHODR** (Institut Pasteur, Biologie des bactéries intracellulaire, CNRS UMR 3525, Paris). Regulation of the mobility of the Lvh-genomic island of *Legionella pneumophila*.

#### ■ 19h00 - 23h00 : DINER - MUSEE DES CONFLUENCES

#### ■ 8h30 - 9h00 : ACCUEIL

#### Session 4. AGENTS ANTI-LEGIONELLA ET RESISTANCE AU TRAITEMENT

Modérateurs : Ghislaine DESCOURS / Max MAURIN

9h00 – 9h30 : **Jean Marc BERJEAUD** (Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Poitiers). Hypersensibilité de *Legionella* à certains biocides d'origine naturelle.

9h30 – 9h50 : **Emilie PORTIER** (Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Poitiers). Potent antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila* and its environmental host, *Acanthamoeba castellanii*.

9h50 – 10h20 : **Clémence MASSIP** (CNR des légionelles, Lyon). Rôle de 2 gènes codant une putative pompe à efflux dans la résistance aux macrolides de *Legionella pneumophila*.

10h20 – 10h40 : **Max MAURIN** (CHU Grenoble). Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones *in vivo*: the Case of *Legionella pneumophila* and Humans.

10h40 – 11h00 : **Sophie JARRAUD / Christophe GINEVRA** (CNR des légionelles, Lyon). Détection pulmonaire chronique de *Legionella* : échecs thérapeutiques, récurrences ou réinfections ?

#### ■ 11h00 - 11h30 : PAUSE - SESSION POSTER

#### Session 5. INTERACTION AVEC SES HÔTES EUCARYOTES - VIRULENCE

Modérateurs : Christophe GILBERT / Laura GOMEZ-VALERO

11h30 – 11h50 : **Luce MENGUE** (UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des Interactions, Poitiers). *Legionella pneumophila* inhibe la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii*.

11h50 – 12h10 : **Anne VIANNEY** (Equipe pathogénie des légionelles, CIRI, Lyon). Role of cyclic-di-GMP signaling and nucleoid-associated proteins in the orchestration of bacterial effectors expression and delivery by the Dot/Icm secretion system during *Legionella* infectious cycle.

12h10 – 12h40 : **Gunnar SCHROEDER** (Imperial College of Science, London). Proteomics approaches to dissect T4SS effector-induced host cell signalling complexes.

#### ■ 12h40 - 14h30 : DEJEUNER - SESSION POSTER

Modérateurs : Elisabeth KAY / Ahmad KHODR

14h30 – 15h00 : **Virginie LELOGEAS** (Equipe pathogénie des légionelles, CIRI, Lyon). Caractérisation de la relation entre *Legionella pneumophila* et l'autophagie de l'hôte.

15h00 – 15h30 : **Laetitia ATTAIECH** (Equipe "Signalisation et Génétique de la Compétence des Bactéries Pathogènes, CIRI Lyon). A FinO-like RNA chaperone and a highly conserved trans-acting sRNA control competence in *Legionella pneumophila*.

15h30 – 15h50 : **Pierre Alexandre JUAN** (Equipe "Signalisation et Génétique de la Compétence des Bactéries Pathogènes, CIRI Lyon). Identification du système de transformation naturelle de *L. pneumophila*.

#### ■ 15h50 - 16h00 : CONCLUSION - PATRICIA DOUBLET

## Comité local d'organisation



S. Jarraud



G. Lina



G. Descours



H. Meugnier

## Le secrétariat

I. Bregeron, H. Benhadj, B. Bavitot, Y. Lakehal et M. Bouton

## Comité scientifique



F. Ader



C. Buchrieser



C. Campese



C. Charpentier



P. Doublet



V. Gaia



Y. Hechard



C. Lawrence



M. Maurin



P. Vanhems

## Bienvenue au SYMPOLEGIO 2015 : *Legionella* de l'environnement à l'homme.

Cher(es) collègues et ami(e)s

C'est toujours un plaisir renouvelé de vous accueillir à LYON pour cette quatrième édition du SYMPOLEGIO « *Legionella* : de l'environnement à l'homme ».

Le SympoLegio a pour vocation de favoriser les échanges scientifiques et le partage des connaissances sur des sujets transversaux concernant notamment l'environnement, les données épidémiologiques de la légionellose, les approches de Whole Genome Sequencing pour le typage des légionelles et pour une meilleure compréhension de la maladie, la résistance/ sensibilité des légionelles et les interactions de *Legionella* avec ses hôtes eucaryotes. Nous espérons que chacun s'enrichira scientifiquement et humainement au cours de ces deux jours.

Comme ce fut décidé initialement, la francophonie reste dominante au SYMPOLEGIO mais nous accueillons avec grand plaisir des orateurs anglophones. Nous remercions nos orateurs et participants plus « lointains » (Algérie, Maroc, Côte d'Ivoire, Angleterre, Suisse, Espagne, Ile de la réunion).

Nous ne saurions conclure sans remercier et exprimer notre reconnaissance sincère à nos parrains et sponsors qui ont contribué à la tenue de SYMPOLEGIO 2015.

Bienvenue à tous et merci de votre participation.

Le Comité d'Organisation

**LEGIONELLES**  
Centre National de Référence

# Communications orales

## Caractéristiques épidémiologiques des cas de légionellose en 2014 en France.



C. CAMPESE

**Christine CAMPESE<sup>1</sup>, Catherine MAINE<sup>1</sup>, Ghislaine DESCOURS<sup>2</sup>, Agnès LEPOUTRE<sup>1</sup>, Laetitia BERAUD<sup>2</sup>, Anne-Gaelle RANC<sup>2</sup>, Christophe GINEVRA<sup>2</sup>, Sophie JARRAUD<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup> Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, France  
c.campese@invs.sante.fr

**E**n 2014, 1 348 cas de légionellose ont été notifiés, soit un taux de déclaration de 2,0 cas pour 100 000 habitants. Le nombre de cas en 2014 est légèrement supérieur à celui de 2013 où 1 262 cas avaient été notifiés. En 2014 l'âge médian des cas était de 63 ans, le sexe ratio homme/femme de 2,7 et la létalité de 10,7% (122 décès/1 286 évolution connue). La majorité des cas (74%) présentait au moins un facteur de risque connu. Le gradient géographique d'incidence Ouest-Est des cas notifiés de légionellose était toujours marqué ; le taux de déclaration variait de 0,8/100 000 en Bretagne à 4,6/100 000 habitants en Franche-Comté.

La majorité des cas (98%) étaient des cas confirmés et la détection des antigènes solubles urinaires était la principale méthode diagnostique utilisée (1 292 cas). Une amplification génique (PCR) avait été positive pour 112 cas et pour 16 cas, la PCR était l'unique méthode de diagnostic biologique. Une souche avait été isolée chez 25% des cas (341/1 348), 92% (314/341) étaient des *Legionella pneumophila* sérogroupe 1. Pour 47 (14%) de ces 341 cas, la souche humaine avait pu être comparée aux souches environnementales isolées d'un lieu fréquenté par le malade, et pour 32 cas les profils génomiques des souches s'étaient révélés identiques permettant ainsi de documenter les lieux probables de contamination.

Une exposition à risque lors de la période d'incubation était rapportée pour 500 cas (37%). Le mode d'exposition le plus fréquent était un voyage (259 cas, 19%), avec un séjour dans un établissement de tourisme pour 139 cas (12%).

En 2014, 228 établissements de tourisme français ont été notifiés aux agences régionales de santé (ARS) par

le réseau européen ELDSNet à la suite d'une exposition de cas notifiés par la France ou un autre pas européen. Parmi ces établissements, 28 avaient accueilli au moins 2 cas sur une période de deux ans, conduisant ainsi à l'émission d'une notification de cluster aux ARS. Pour 24 de ces établissements, une investigation a été réalisée en 2014 et les prélèvements issus du réseau d'eau sanitaire ont révélé la présence de légionelles au-dessus du seuil réglementaire pour 12 (50%) d'entre eux.

Par ailleurs, de nombreuses investigations de cas communautaires regroupés dans le temps et dans l'espace (de 2 à 10 cas) ont été réalisées par les ARS en collaboration avec les Cires. Parmi ces investigations 5 ont fait l'objet d'une information au niveau des autorités nationales. Aucune source commune de contamination n'a pu être identifiée lors des investigations menées en 2014. Bien qu'infructueuse, l'ensemble des investigations menées par les ARS contribuent à soutenir la vigilance des exploitants vis-à-vis des mesures de gestion des réseaux d'eau chaude et installations à risque.

Malgré une légère augmentation du nombre de cas de légionellose en 2014 par rapport à 2013, ce bilan montre une stabilité des caractéristiques des cas et des expositions retrouvées. Le taux de d'incidence des cas notifiés en France est supérieur au taux européen (1,1 pour 100 000 habitants en 2013) mais proche de celui des pays voisins (Italie et Espagne). Le gradient «Ouest-Est» géographique du taux d'incidence constaté ces dernières années fait l'objet d'une étude multifactorielle qui vise à expliquer ces disparités d'incidence de la légionellose sur le territoire. Il est important que la proportion de cas avec isolement de souches continue de progresser afin de disposer d'une meilleure capacité d'identification des sources de contamination et de documentation des cas groupés.

## Surveillance de la Légionellose en France : retour des enquêtes épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014.



L. BERAUD

**Laetitia BERAUD<sup>2</sup>, Christine CAMPESE<sup>1</sup>, Ghislaine DESCOURS<sup>2</sup>, Agnès LEPOUTRE<sup>1</sup>, Anne-Gaëlle RANC<sup>2</sup>, Catherine MAINE<sup>1</sup>, Christophe GINEVRA<sup>2</sup>, Gérard LINA<sup>2</sup>, Sophie JARRAUD<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institut National de Veille Sanitaire, Saint Maurice, France

<sup>2</sup> Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, France

En France, environ 1 300 cas de légionellose sont diagnostiqués chaque année. Les souches cliniques sont disponibles dans 22% des cas et sont typées par le CNR à l'aide de 3 techniques : typage par anticorps monoclonaux (mAb), *Sequence Based Typing* (SBT) et analyse du profil de macro-restriction de l'ADN (PFGE). Des investigations environnementales sont réalisées de manière systématique dans certains contextes (ex : cas nosocomiaux ou groupés) ou lorsqu'une source de contamination est fortement suspectée. Les souches environnementales isolées sont systématiquement envoyées au CNR pour typage si le CNR dispose d'une souche clinique. L'objectif de cette étude est de décrire les résultats de comparaison des souches des cas notifiés entre 2008 et 2014 avec ces souches environnementales.

Sur les 9068 cas, 1 948 (22%) souches cliniques ont été isolées. La majorité (95%) étaient des *Legionella pneumophila* sérogroupe 1, dont 29% appartenaient aux clones endémiques et 43% appartenaient aux 4 Sequence Type (ST) majeurs (ST1, ST23, ST47, ST62). Une souche environnementale était disponible pour 18% (349) des cas avec souche (soit 3,9% de l'ensemble des cas). Pour 338 cas, la souche clinique a été comparée aux souches environnementales issues d'un site et pour 11 provenant de 2 différents sites portant le total du nombre des comparaisons à 360. Les souches cliniques et environnementales étaient identiques (Mab + ST + profil PFGE) dans 54% (195/360) des comparaisons. Ces investigations microbiologiques se sont révélées positives pour 80% (12/15) de maisons de retraite investiguées, 70% (55/78) d'hôpitaux, 67% (59/88) de domicile, 67% (35/52) d'établissements touristiques,

56% (27/46) d'autres structures (spa, lieu de travail, etc). Les tours aéroréfrigérantes n'ont été incriminées que pour 9% des investigations. Cependant, parmi les comparaisons montrant des profils identiques, 40% correspondaient à des souches endémiques rendant incertaine l'identification de la source.

Pour plus de 50% des investigations réalisées, les souches cliniques et environnementales présentaient des profils identiques, ne représentant néanmoins que 2,2% de l'ensemble des cas de légionellose. Il apparaît important de disposer de prélèvements cliniques afin de permettre ces investigations. Le développement de nouveaux outils comme le Séquençage de Génome Complet devrait permettre une meilleure discrimination, notamment dans le cas de souches endémiques.

## Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéro-réfrigérantes des centres nucléaires de production électrique d'EDF sur la survenue de cas de légionellose en France de 2010 à 2012.



C. CAMPESE

**CHRISTINE CAMPESE<sup>1</sup>, GHISLAINE DESCOURS<sup>2</sup>, RÉMI POIRIER<sup>3</sup>, JULIETTE HOSPITALIER<sup>3</sup>, DIDIER CHE<sup>1</sup>, SOPHIE JARRAUD<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institut de Veille Sanitaire (InVS)

<sup>2</sup> Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, France (CNR-L)

<sup>3</sup> Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Maisons Alfort, France (Anses)

L'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses), le Centre national de référence des légionelles (CNR-L) et l'Institut de veille sanitaire (InVS) ont été chargés par la Direction générale de la santé (DGS) de conduire une étude visant à apprécier le lien entre l'exposition aux retombées des panaches émis par les 28 grandes Tours aéro-réfrigérantes (Tars) des 11 Centres nucléaires de production électrique (CNPE) d'Electricité de France (EDF) contrôlées par l'Autorité de sûreté nucléaire (ASN) et la survenue de cas de légionellose à proximité de ces installations.

Cette étude a été menée par l'Anses le CNR-L et l'InVS en collaboration avec les 18 Agences régionales de santé concernées. L'étude a inclus tout cas confirmé de légionellose ayant une date de début des signes comprise entre le 1er janvier 2010 et le 31 décembre 2012 et ayant fréquenté ou résidé au sein de la zone géographique des 20km autour d'un des 11 CNPE d'EDF au cours de la période supposée d'exposition, soit 14 jours avant la date du début des signes. Les souches cliniques disponibles ont été analysées par le CNR-L. En parallèle, les services EDF ont également transmis les souches environnementales isolées des installations CNPE obtenues dans le cadre de leur programme de surveillance obligatoire afin qu'elles soient comparées aux souches cliniques, par le CNR-L, par les méthodes génotypiques.

Au cours de la période 98 cas ont été inclus. Parmi ces cas une souche d'origine clinique a pu être isolée pour 33 cas (33,7%). Le nombre de cas de légionellose résidant attendus dans les communes concernées au cours des trois années d'étude était

de 91 cas [IC95% : 73-111] et 65 cas résidants ont été observés. Par ailleurs, les profils génomiques des souches d'origine clinique et environnementale isolées n'ont montré aucune similitude. Les résultats de l'étude ne mettent pas en évidence d'association entre l'exposition aux panaches des Tars des CNPE et la survenue des cas de légionellose inclus. Toutefois, les résultats de l'étude n'ont pas pu prendre en considération les éléments liés aux variations des populations de légionelles et à l'échantillonnage des prélèvements environnementaux.

L'ensemble des partenaires impliqués dans la surveillance des légionelloses, notamment à proximité des CNPE, devra rester vigilant et assurer les investigations épidémiologiques, microbiologiques et environnementales nécessaires. La compilation de ces investigations permettra à l'avenir de compléter ces premiers résultats.

## A convoluted outbreak – exploring the hidden side of the moon.



S. CRESPI

### Sebastian CRESPI

Policlinica Miramar, Clinical Laboratory, Palma de Mallorca, Spain

Forty-three cases of Legionnaires' disease (LD) occurred in a hotel in Calpe, Spain, from November 2011 till June 2012. Beside tourists, five hotel workers were also infected. Six patients died. *Legionella pneumophila* sgp1, Mab France/Allentown, ST23 was isolated from clinical samples. Along this period, many investigations were carried out by both the Public Health Authorities and by different consultants. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) sent an expert mission there. Initially, the origin of the outbreak was attributed to the domestic water system but in spite of the stringent control measures implemented, the outbreak recurred on several occasions. The hotel had to be closed twice.

In February 2012, *L.pneumophila* sgp1 ST23 was isolated from the hydrotherapy pool, located at the hotel basement, thus raising suspicion on this particular water system as the possible source of infection. Subsequent smoke-tracing studies and airflow dynamics models showed that aerosols from the spa area could reach easily the hotel lobby in different ways. The pool was cleaned and disinfected repeatedly but the infecting strain survived the treatment and new recurrences occurred. In July 2012, a thorough technical revision of the pool structure lead to the discovery of multiple hidden cavities under the pool vessel that were filled with stagnant water, with direct connections to the bathing water. Samples from the cavities failed to grow *Legionella* but were positive on PCR. The hydrotherapy pool was subsequently demolished. Since then, no new cases of LD have been notified.

## Investigation d'une suspicion de cas groupés de légionellose, Aurillac (Cantal) : exploration des sources d'exposition environnementales.



E. VAISSIERE

### E. VAISSIERE<sup>1</sup>, M. LACASSAGNE<sup>2</sup>, S. MAGNE<sup>2</sup>, C. CAMPESE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cellule de l'Institut de veille sanitaire en région Auvergne, Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup>Agence régionale de santé, Délégation territoriale du Cantal, Aurillac, France

<sup>3</sup>Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France

**Introduction :** A Aurillac, la survenue de deux épisodes de cas groupés de légionellose en décembre 2012 et janvier 2015, ainsi que la récurrence d'un même profil de souche retrouvé chez 89% des cas prélevés depuis 2008, amènent à l'hypothèse d'une source commune de contamination localisée dans l'agglomération, mais encore non identifiée.

**Objet de l'étude :** L'objectif de cette étude est de décrire les cas de légionellose signalés à Aurillac depuis 2008 et de présenter l'avancement des investigations environnementales.

**Méthodes :** Une définition de cas a été élaborée afin de recenser les cas de légionellose signalés depuis 2008 (avec ou sans isolement de souche clinique), étant domiciliés ou ayant fréquenté l'agglomération d'Aurillac durant leur période d'incubation. Les déplacements et activités à risque de chacun des cas ont été analysés afin d'identifier une zone de fréquentation commune. L'enquête environnementale a consisté à recenser et investiguer toutes les sources potentiellement émettrices de légionelles dans le secteur défini : tours aérorefrigérantes, laveurs d'air industriels, brumisateur de grande surface, plateforme de compostage, station d'épuration à boues activées. Une visite au domicile a également été organisée pour effectuer des relevés de températures et des prélèvements d'eau, afin d'écarter l'hypothèse d'une contamination du réseau d'eau chaude sanitaire.

**Résultats :** Entre 2008 et début 2015, 16 cas répondant à la définition de cas ont été inclus dans l'étude. L'âge médian des cas est de 57 ans (min : 41 ans, max : 85 ans). Parmi eux, 81% présente un facteur de risque et deux sont décédés, soit une létalité de 13%. L'isolement de souches cliniques par le CH d'Aurillac, qui est significativement

supérieur au reste de la France (56% contre 21%,  $p < 10^{-9}$ ), permet de mettre en évidence l'émergence d'un profil particulier de légionelles « Pulsotype F, ST 259, sous-groupe Philadelphia », retrouvé chez 89% des cas prélevés. Sur la même période d'étude, 16% des souches isolées au niveau national et présentant ce profil, sont en provenance de patients domiciliés ou ayant séjourné à Aurillac. Si les prélèvements environnementaux réalisés jusqu'à présent n'ont pas permis de retrouver la légionelle à l'origine des cas, la démarche mise en place sous l'impulsion de l'ARS a permis la mobilisation de la préfecture et des services en charge du contrôle des TAR. En complément du recueil des résultats d'autosurveillance, une campagne de prélèvements inopinés et des inspections ciblées ont été effectuées en 2013 sur certaines d'entre elles. Un plan d'actions préventives a été adopté dans l'entreprise disposant de laveurs d'air : opérations régulières de nettoyage/désinfection, recherche annuelle de légionelles, formation du personnel.

**Conclusion :** Les prochaines investigations pourraient porter sur la station d'épuration à boues activées d'une capacité de 40 000 eq-hab. Des épidémies communautaires et des cas de légionellose chez des agents de STEP ont déjà été décrits dans la littérature. Une campagne de sensibilisation à destination des entreprises d'installation et de maintenance des TAR est également prévue, dans le but d'identifier d'éventuelles installations non répertoriées. La vigilance est maintenue face à tout nouveau cas signalé.

## Analyse probabiliste des données d'une épidémie de légionelloses : contribution à l'évaluation du risque.



F. WALLET

**F. WALLET<sup>1</sup>, L. FONTENAY<sup>2</sup>, PA CABANES<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Service des Etudes Médicales, EDF, Immeuble Carré Vert, 45 rue Kléber, 92309 Levallois Perret Cedex

<sup>2</sup> Société de Calcul Mathématique, 111 Faubourg Saint Honoré, 75008 Paris, France

Nous avons analysé les données de la plus importante épidémie française de légionelloses survenue dans le Pas de Calais de novembre 2003 à janvier 2004. L'origine de cette épidémie fut attribuée à une tour aérofrigorifère industrielle. Les données cliniques (date de début des symptômes, souche clinique) et les données environnementales (quantification des légionelles, identification ou non de la souche épidémique, périodes de fonctionnement de l'installation), sont disponibles dans les rapports d'investigation de l'épidémie.

Une souche épidémique, nommée souche Lens, a été retrouvée sur les prélèvements de 23 cas de légionellose sur les 86 cas confirmés. Cette souche épidémique a été isolée dans des tours aérofrigorifères industrielles ainsi que dans une lagune de traitement d'eaux industrielles.

A l'aide d'une méthode probabiliste, nous avons déterminé la date potentielle d'exposition en tenant compte d'une période d'incubation de 2 à 10 jours, modélisée par une loi uniforme ou une loi log-normale. Nous avons montré, avec cette méthode, que cette épidémie était constituée de trois vagues successives. Les deux premières vagues correspondent respectivement à 14 et 22 % des cas dont l'origine pourrait être une source ponctuelle. La troisième vague correspond à 64 % des cas et pourrait être attribuée à une source diffuse. Les 23 cas sur lesquels la souche épidémique a été détectée se répartissent dans les deux premières vagues de l'épidémie.

Dans une deuxième phase d'analyse basée sur des données de fonctionnement des installations à risque potentielles et sur diverses hypothèses (aérosolisation des légionelles, capacité de dispersion, durée d'émission des aérosols, pourcentage de patients exposés, probabilité d'exposition pour chaque cas), nous avons estimé la ou les sources les plus probables de chaque vague de l'épidémie. Pour les trois vagues de l'épidémie, 65% des 86 cas (*pour la loi uniforme*) et 58 des 86 cas (*loi lognormale*) ont une probabilité non nulle d'avoir été exposés à la tour aérofrigorifère incriminée. Ce qui implique que 35% des 86 cas (*pour la loi uniforme*) et 42 % des 86 cas (*loi lognormale*) ont une probabilité nulle d'avoir été exposés à cette installation. En revanche, 100 % des cas ont une probabilité non nulle d'avoir été exposés à la lagune industrielle.

Ce travail exploratoire pourrait apporter des informations importantes pour l'évaluation de risque microbiologique, notamment en termes d'exposition à une installation donnée pouvant guider les investigations.

## Nouvelle méthode rapide de dénombrement semi-quantitatif des *Legionella pneumophila* cultivables.



S. DUKAN

**Audrey DUMONT<sup>1</sup>, Emilie FUGIER<sup>1</sup>, Sam DUKAN\*<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> CLICK4TAG, Grand Luminy Technopole, Zone Luminy Entreprise Biotech, Case 922, 163 Av. de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09

Comme l'atteste l'article paru dans la revue *Angewandte Chemie International Edition* (2014, 53, 1275-1278) nous avons apporté la preuve de concept d'une nouvelle méthode alternative permettant de détecter spécifiquement la bactérie *Legionella pneumophila*. L'originalité de cette méthode tient dans l'utilisation d'un monosaccharide portant une fonction chimique reportrice qui, une fois assimilé uniquement par les *L. pneumophila* cultivables, sera révélé par click-chemistry. La valorisation de ces travaux de recherches menées par les équipes de Sam Dukan (Institut de Microbiologie de la Méditerranée (CNRS/Université Aix-Marseille), Laboratoire de Chimie Bactérienne (CNRS/Aix Marseille Université) et de Boris Vauzeilles (Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS), Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (CNRS/Université Paris Sud) ont conduit à la création fin 2014 de la SAS CLICK4TAG. Click4Tag est spécialisée dans le développement de solutions permettant la détection, le dénombrement la concentration et/ou l'identification rapide de microorganismes pathogènes. Fort de cette nouvelle technologie de rupture, et dans moins de 24 mois, nous commercialiserons le kit LpDCLICK permettant d'effectuer un dénombrement semi-quantitatif de *L. pneumophila* cultivables en moins de 20 heures pour les fortes contaminations et moins de 40 heures pour les faibles contaminations. Le kit LpDCLICK a les avantages suivants

- 1 - peut être utilisé sur le terrain ;
- 2 - ne nécessite aucun équipement spécifique ;
- 3 - ne nécessite aucune compétence particulière ;
- 4 - ne détecte que les *L. pneumophila* cultivables ;

5 - donne l'alerte en moins de 20 heures en cas de forte contamination en *L. pneumophila* ;

6 - peut être automatisé

Lors de Sympolegio 2015, nous présentons le principe de cette rupture technologique ainsi que les premières expériences réalisées sur de nombreux sérogroupes de *L. pneumophila* ainsi qu'un ensemble d'autres microorganismes montrant (i) la spécificité de détection de *L. pneumophila*, (ii) la très bonne corrélation entre les résultats obtenus avec LpDCLICK et la méthode culturale basée sur la norme AFNOR NFT90-431.

## Caractérisations physiques et physiologiques des aérosols de légionelles atteignant la région thoracique.



S. ALLEGRA

**S. ALLEGRA, L. LECLERC, F. GIRARDOT, S. RIFFARD, J. POURCHEZ**

UMR 5600 EVS-ISTHME, LINA EA 4624, BIOPI EMSE, SAINT-ETIENNE

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires des environnements aquatiques naturels et anthropiques pouvant être responsables d'une pneumopathie sévère la légionellose (10 % des cas communautaires et 30% des cas nosocomiaux). Cette pathologie se déclare après l'inhalation d'aérosols chargés en légionelles, ou en amibes contaminées. Dans le cadre de la prévention du risque «*Legionella*», il reste difficile de corrélérer les taux de légionelles détectés à un risque infectieux, du fait: (i) de l'analyse (par culture AFNOR NF T90-431 ou par PCR AFNOR NF T90-471) d'échantillons ne permettant pas une mesure de l'exposition réelle, (ii) de la présence dans les échantillons de légionelles viables non cultivables (VBNC) et (iii), d'inhibiteurs naturels ou générés suite aux traitements de décontamination des eaux.

Les données sur la contamination biologique aéroportée et les doses infectieuses sont presque inexistantes. La mesure de la présence d'aérosols infectieux constitue pourtant le seul moyen d'évaluer l'exposition réelle des individus aux légionelles. Peu d'études évaluent la concentration et l'état physiologique des légionelles dans l'aérosol. De plus, il est difficile de comparer ces études entre elles car les résultats dépendent du préleveur d'air utilisé et du milieu de récupération, ainsi que des méthodes utilisées pour quantifier les légionelles (culture, qPCR, FISH...).

Nous avons développé un modèle expérimental permettant la description des aérosols de légionelles en termes de tailles, quantités, nombre et dangerosité atteignant la région thoracique humaine. Les aérosols sont générés sur un modèle ORL :

modèle stéréolithographié de tête humaine (Patent WO/2002/058462), branchée sur une pompe reliée à un filtre permettant de modéliser le territoire pulmonaire.

Cette étude présente la validation de ce modèle et les aspects d'hygiène et de sécurité. Nos premiers résultats montrent la pertinence de l'utilisation de ce modèle pour mieux caractériser le risque «*Legionella*» : déterminer la proportion de légionelles VBNC, pathogènes ou potentiellement pathogènes (culture, qPCR, cytométrie en flux), pouvant être aérosolisée à partir d'un environnement naturel ou anthropique (douches des établissements de soins, rejets de TAR (Tour Aéro-Réfrigérante), et fournir de nouvelles données pour l'optimisation des normes et de la réglementation concernant les légionelles.

## Identification and subtyping of *Legionella pneumophila* Strains by Whole Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry (WCMS) using PAPMID (Putative Assigned Protein Masses for Identification Database).



J. F. POTHIER

**Joël F. POTHIER<sup>1</sup>, Frédéric FOUCAULT<sup>2</sup>, Valentin PFLÜGER<sup>2</sup>, Valeria GAIA<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Zurich University of Applied Sciences ZHAW, Institute of Natural Resources Sciences, Environmental Genomics and Systems Biology Research Group, Wädenswil, Switzerland

<sup>2</sup> Mabritec AG, Riehen, Switzerland

<sup>3</sup> National Reference Centre for *Legionella*, Bellinzona, Switzerland

Whole Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry (WCMS) has become a valuable tool for the identification of many pathogens including *Legionella* spp. WCMS is usually used for species identification, but recent studies suggest that WCMS can also be used for subtyping purposes. Currently, monoclonal antibodies (mAb) subgrouping and Sequence-Based Typing (SBT) are the established methods used for the characterization of *L. pneumophila* strains. To assess the usefulness of WCMS for subtyping of *L. pneumophila*, WCMS data were compared to serological and molecular typing results (serotyping, mAb and SBT).

We applied the PAPMID (Putative Assigned Protein Masses for Identification Database) approach, therefore ribosomal subunit protein masses are *in silico* calculated and used as biomarker masses. Such marker-based approach has a higher resolution for subtyping than current pattern-based MALDI-TOF approach.

Eighty-eight public available *L. pneumophila* genomes covering 26 SBT sequence types were used to establish a PAPMID *L. pneumophila* database module. The PAPMID approach was validated 76 *L. pneumophila* clinical strains belonging to different serogroups. In addition, 21 *L. pneumophila* serogroup 1 strains belonging to the EUL "related" and "stability" panels were used to evaluate the method. All *Legionella* strains were analyzed by WCMS with the AXIMA@PAPMID platform (Shimadzu).

The PAPMID approach revealed beside species identification a high discrimination for *L. pneumophila* on the level of SBT clonal complexes and to some extent even on sequence type level. Therefore the MALDI-

TOF MS in combination with the PAPMID database is promising tool for a rapid and accurate typing of *L. pneumophila* in the framework of epidemiological and monitoring programs.

## The evaluation of whole genome sequencing for the epidemiological typing of *Legionella pneumophila*.



S. DAVID

**Sophia DAVID<sup>1,2</sup>, Martin ASLETT<sup>1</sup>, Rediat TEWOLDE<sup>2</sup>, Simon HARRIS<sup>1</sup>, Massimo MENTASTI<sup>2</sup>, Baharak AFSHAR<sup>2</sup>, Anthony UNDERWOOD<sup>2</sup>, Julian PARKHILL<sup>1</sup> & Timothy HARRISON<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK ;

<sup>2</sup> Public Health England, 61 Colindale Avenue, London, UK

**O**bjectives : Human infections with *Legionella pneumophila* are acquired directly from a contaminated environmental source. The characterisation of clinical and epidemiologically linked environmental isolates is crucial for locating the source and determining the extent of infection. We compared a range of whole genome sequencing (WGS) methods for the epidemiological typing of *L. pneumophila* and compared their performance to that of current typing techniques.

**Methods** : A number of WGS methods were tested including SNP/mapping-based, kmer-based, gene presence-based and whole genome MLST (wgMLST) approaches. These were tested using WGS data from the EWGLI standard typing panel comprising 106 isolates and 17 sets of epidemiologically related isolates, as well as a further 252 isolates comprising five major disease-associated sequence types.

**Results** : All WGS-based methods are highly discriminatory between isolates of the typing panel, achieving indices of discrimination between 0.980 and 0.999. For each method and using isolates from well-defined point source outbreaks, we defined the number of genomic differences allowed for isolates to be considered part of the same point source outbreak. This allowed us to both confirm and refute ties between previously linked isolates. Furthermore, total differentiation between epidemiologically related and unrelated isolates is not achieved with any method.

**Conclusions** : WGS-based methods achieve higher discrimination than current typing techniques including sequence-based typing (the gold standard). However, even methods that provide the highest resolution show

that a number of epidemiologically unrelated isolates are as genetically similar to each other as related isolates, highlighting the continuing importance of epidemiological information in outbreak investigations.

## The *legionella* genus genome: comparative genomics of the entire bacterial genus.



L. GOMEZ-VALERO

**Laura GOMEZ-VALERO<sup>1</sup>, Christophe RUSNIOK<sup>1</sup>, Sandra REUTER<sup>2</sup>, Gunnar N. SCHROEDER<sup>3</sup>, Sophie JARRAUD<sup>4-5</sup>, Elizabeth HARTLAND<sup>6</sup>, Gad FRANKEL<sup>3</sup>, Gordon DOUGAN<sup>2</sup> and Carmen BUCHRIESER<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institut Pasteur, Unite de Biologie des Bactéries Intracellulaires.Paris, France and CNRS UMR 3525 Paris, France

<sup>2</sup> The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK

<sup>3</sup> MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College London, London, United Kingdom

<sup>4</sup> CIRI, International Center for Infectiology Research, Inserm, U1111, CNRS, UMR5308, Université Lyon 1, École Normale Supérieure de Lyon, Lyon F-69008, France

<sup>5</sup> National Reference Center of *Legionella*, Hospices Civils de Lyon, Bron, 69677, France

<sup>6</sup> Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia

**L**egionellosis or Legionnaires' disease (LD) is a severe pneumonia caused by bacteria belonging to the genus *Legionella*. Currently there are 61 species/subspecies described within this genus but over 95% of Legionnaires' disease cases are caused by only two species: *L. pneumophila* and *L. longbeachae*. These epidemiological data raise the question: what are the factors conferring this higher capacity to infect humans to these species? To try to answer this question, we have sequenced 49 new *Legionella* genomes representing 47 newly sequenced species and we are characterizing their genetic composition through comparative genomics. Together with the already published genomes, we are analyzing and comparing 80 genomes representing 58 species-subspecies, therefore providing a quasi-complete overview of the genus *Legionella*. Furthermore all strains are being tested for their ability to infect and replicate in the amoebal host *Acanthamoeba castellanii* and in a human macrophage cell line (THP-1). First results showed that the *Legionella* genomes differ considerably in size (2.2-4.2Mb), gene content and effector repertoire. Here we will present our first results of this global comparative study, a knowledge that will not only be essential for *Legionella* research, but also a step towards the study of genomic diversity at the bacterial genus level.

## Regulation of the mobility of the Lvh-genomic island of *Legionella pneumophila*.



A. KHODR

**Ahmad KHODR<sup>1,2</sup>, Christophe RUSNIOK<sup>1,2</sup>, Tobias SAHR<sup>1,2</sup>, Pierre Emmanuel DOUARRE<sup>3</sup>, Laura GOMEZ-VALERO<sup>1,2</sup>, Elisabeth KAY<sup>4</sup>, Philippe GLASER<sup>3</sup> and Carmen BUCHRIESER<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Institut Pasteur, Biologie des Bactéries Intracellulaires, Paris, France and <sup>2</sup>CNRS UMR3525, Paris, France ; <sup>3</sup>Unité de Biologie des Bactéries pathogènes à Gram-positif, Institut Pasteur, Paris, France. <sup>4</sup>CIRI, Centre for Infectiology Research, *Legionella* Pathogenesis Team, Université de Lyon, Lyon, France

**B**ackground : Horizontal gene transfer (HGT) and mobile genetic elements (MGEs) are major generators of genome plasticity and diversity. Certain of these elements can exist in the *Legionella pneumophila* (Lp) genome in an excised or integrated form and encode for type IV secretion systems (T4SS) and/or conjugation systems. Intriguingly, each of these elements encodes a homologue of CsrA (carbon storage regulator). CsrA is a RNA binding protein and a global regulator of virulence in *L.p.* The Lvh-region is one of these MGEs encoding a T4ASS and a CsrA homologue. It has been shown previously that it can exist integrated in the chromosome or as a multi-copy plasmid. Its mobility is mediated by a phage-like integrase.

**Methods** : Distribution of the Lvh was analyzed by comparative genomics of 50 *L.p.* strains, the mobility and regulation of transfer were analyzed by mutagenesis, conjugation experiments, Q-PCR, RNA-Seq and whole genome sequencing of the transconjugants.

**Results** : We showed that the Lvh-region is transferable at a rate of  $10^{-4}$  and inserts specifically in the *tmRNA* gene in all analysed transconjugants. Using a  $\Delta dotA$  mutant strain we showed that the Dot/Icm T4SS is implicated in the conjugation of the lvh-region, as the transfer rate drops to  $10^{-7}$ . Conjugation experiments in an *ihf* mutant strain (Integration host factor), a nucleoid-associated protein revealed its role in the mobility of the Lvh. Furthermore; we show that the putative RNA-binding protein LvrC (CsrA

homologue) also affects the mobility of the Lvh-region. Surprisingly, RNA-seq and bioinformatic analysis of the various CsrA homologues present in different *Legionella* strains combined with EMSA experiments between LvrC, RsmY and RsmZ suggest a possible wider regulatory role of LvrC and of other ICE encoded CsrA homologues.

**Conclusions** : The mobility of the predicted self-transmissible Lvh-genomic Island is regulated by a complex network of global (IHF) and specific regulatory proteins (LvrC) and depends largely on the Dot/Icm T4SS.

## Hypersensibilité de *Legionella* à certains biocides d'origine naturelle.



J.M. BERJEAUD

**J.M. BERJEAUD, C. LOISEAU, M. SCHLUSSELHUBER, A. MARCHAND, J. VERDON**

Université de Poitiers, Ecologie & Biologie des Interactions, CNRS UMR7267 Equipe Microbiologie de l'eau, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers cedex 9, France

**L***egionella pneumophila* est l'agent responsable de la légionellose. Cette bactérie colonise les milieux aqueux naturels (lacs et rivières) et artificiels comme les réseaux d'eaux chaudes et les tours aéro-réfrigérantes (TAR). Ces dernières sont en effet une source importante de transmission des légionelles par le biais des gouttelettes du panache. Des traitements biocides sont aujourd'hui utilisés pour maintenir la concentration en légionelles inférieure à  $10^3$  UFC/L.

Le choix des biocides est un compromis entre leur efficacité envers les légionelles et le respect de l'environnement. Aussi, depuis plusieurs années nous avons recherché des composés d'origine naturelle permettant de contrôler le développement de cette bactérie pathogène tout en respectant l'environnement.

Les molécules que nous avons identifiées comme présentant une activité anti-*Legionella* sont assez variées en termes de structures biochimiques et d'origine. Nous avons ainsi purifié, caractérisé et parfois étudié le mode d'action de peptides produits par des bactéries du genre staphylocoque. Plus récemment des peptides antimicrobiens synthétisés à partir de séquences déduites de gènes d'un invertébré marin, *Ciona intestinalis*, se sont avérés particulièrement efficaces pour inhiber cette bactérie pathogène ainsi que les amibes qui l'hébergent. La surfactine, un lipopeptide produit par *Bacillus subtilis* a récemment été caractérisée pour cette activité. Bien que le mode d'action anti-*Legionella* de tous ces divers composés n'ait pas encore été analysé dans le détail, il ressort que ces différentes molécules ont

une action membranolytique. Mais le résultat le plus remarquable et intrigant est que tous ces biocides sont actifs uniquement contre toutes les bactéries du genre *Legionella* testées, ou au moins que les *Legionella* y sont beaucoup plus sensibles que les autres genres bactériens.

## Potent antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila* and its environmental host, *Acanthamoeba castellanii*.



E. PORTIER

**Emilie PORTIER<sup>1</sup>, Margot SCHLUSSELHUBER<sup>1</sup>, Vincent HUMBLLOT<sup>2</sup>, Sandra CASALE<sup>2</sup>, Christophe METHIVIER<sup>2</sup>, Julien VERDON<sup>1</sup>, Matthias LEIPPE<sup>3</sup>, Jean Marc BERJEAUD<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Poitiers, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Réactivité de Surface, UMR CNRS 7197, Paris, France

<sup>3</sup> Institut de zoologie, Immunologie comparée, Kiehl, Allemagne

*L. pneumophila* est le principal agent responsable de la maladie du légionnaire. Ce pathogène est très souvent retrouvé dans l'environnement, et sa présence est généralement corrélée à celle des amibes. En effet, les protozoaires ont un rôle important dans l'écologie et la pathogénicité de *L. pneumophila*. Ils leur permettent de se multiplier, de persister dans l'environnement et de résister aux traitements biocides. De plus, il a été montré que la croissance intra-amibienne rend les bactéries plus virulentes. Afin de contrôler son développement et réduire les risques d'épidémies, les recherches s'orientent sur l'identification et l'utilisation de nouvelles biomolécules plus spécifiques, comme les peptides antimicrobiens. *L. pneumophila* étant protégée par son hôte amibien, il nous a paru opportun de chercher des molécules possédant également une activité dirigée contre ces protozoaires.

Dans cette étude, trois peptides antimicrobiens ont été testés pour leur activité anti-*Legionella*, NK-2, Ci-MAM-A24 et Ci-PAP-A22 (Andra and Leippe, 1999 ; Fedders et al., 2008). Le peptide Ci-MAM-A24 (0,1 à 0,4 µM) présente l'activité anti-*Legionella* la plus efficace. Il entraîne une perméabilisation membranaire puis la libération du contenu cellulaire. Les deux autres peptides testés, présentent également une activité anti-*Legionella*, mais à des concentrations plus élevées (1,6 à 25 µM pour Ci-MAM-A24 et 0,2 à 0,8 µM). Ci-MAM-A24 a ensuite été immobilisé sur une surface en or afin de vérifier son activité antimicrobienne. Les résultats suggèrent qu'il possède toujours son activité anti-*Legionella* même après son immobilisation.

Les trois peptides ont finalement été testés pour leur effet cytotoxique sur les amibes. Seul Ci-MAM-A24 (< 12,5 µg/ml) possède une activité anti-amibe, perméabilisant 85% des trophozoïtes. Il est également le seul à agir sur les *L. pneumophila* intra-amibe (12,5 µM). Ci-MAM-A24 possède donc une activité directe et indirecte sur *L. pneumophila*. Il pourrait représenter un bon candidat pour le contrôle biologique de *L. pneumophila* dans les réseaux d'eau. Néanmoins, d'avantages d'investigations seront nécessaires afin d'évaluer ses capacités d'actions dans l'environnement, et sur différentes surfaces.

## Rôle de Lpp2879-2880 dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides.



C. MASSIP

**MASSIP C.<sup>1-2</sup>, GILBERT C.<sup>2</sup>, GINEVRA C.<sup>1-2</sup>, DOUBLET P.<sup>2</sup>, JARRAUD S.<sup>1-2</sup>, DESCOURS G.<sup>1-2</sup>**

<sup>1</sup> Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, 59 Bd Pinel, 69677 Bron Cedex, France

<sup>2</sup> CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, France

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) recommande les macrolides, préférentiellement l'azithromycine, comme traitement de première intention de la légionellose. Bien que *L. pneumophila* soit décrite comme constamment sensible aux macrolides, des souches résistantes peuvent aisément être sélectionnées *in vitro*. De plus, des échecs thérapeutiques sont régulièrement décrits et la légionellose reste associée à un taux de mortalité de 10 % malgré une antibiothérapie adéquate.

Afin de caractériser les mécanismes de résistance aux macrolides de *L. pneumophila*, le Centre National de Référence des légionelles a sélectionné six souches résistantes à l'azithromycine à partir de la souche de référence de *L. pneumophila* « Paris » par pression antibiotique croissante. Toutes portaient des mutations au niveau des gènes codant l'ARN ribosomique 23S et les protéines ribosomiques L4 et L22. Deux souches présentaient aussi des mutations dans la zone promotrice des gènes *lpp2879-2880*, homologues aux gènes de pompe à efflux *acrAB* d'*E. coli* d'après une étude bioinformatique. Associées à la protéine de membrane externe TolC, AcrAB forment une pompe à efflux tripartite impliquée dans la résistance à de nombreux antibiotiques et toxiques. Chez *L. pneumophila*, la fonction de *lpp2879-2880* n'ayant jamais été établie, nous avons étudié leur rôle dans la résistance aux macrolides.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour différents antibiotiques et toxiques de la souche « Paris » délétée ( $\Delta$ *lpp2879-2880*) ont été comparées à celles des souches sauvage et délétée complétée. La délétion de l'opéron *lpp2879-2880* entraîne une sensibilité accrue aux macrolides : érythromycine, azithromycine et spiramycine, mais n'impacte pas la sensibilité aux autres composés testés.

Les gènes *lpp2879-2880* ont été recherchés dans les génomes de plus de 200 souches cliniques de

*L. pneumophila* de différents Sequence Type (ST). Parmi ces souches, l'opéron *lpp2879-2880* est spécifiquement présent dans le génome des souches ST1 (ST de la souche « Paris ») et ST701 ou de ST proches. Ces clones présentent une sensibilité diminuée à l'azithromycine.

Enfin, l'impact des mutations observées dans la zone promotrice de l'opéron *lpp2879-2880* (dans le site de fixation du ribosome et à proximité du promoteur) dans deux des lignées rendues résistantes *in vitro* à l'azithromycine a été étudié par fusion traductionnelle en utilisant le gène codant la protéine de fluorescence verte (GFP) comme rapporteur. Ces mutations entraînent une augmentation de la synthèse de GFP. L'exposition aux macrolides induit également l'expression de GFP, en présence mais également en absence de mutation dans la zone promotrice.

Au total, l'opéron *lpp2879-2880* est impliqué dans l'efflux spécifique des macrolides. Alors que les mécanismes de résistance de haut niveau (mutations des gènes codant l'ARNr 23S ou les protéines L4 et L22) n'ont encore jamais été détectés dans des souches cliniques de *L. pneumophila*, cet opéron serait à l'origine de la sensibilité diminuée du clone endémique mondial ST1 pour l'azithromycine. De plus, l'exposition aux macrolides induirait une surproduction de *lpp2879-2880*, contribuant potentiellement à cette sensibilité diminuée.

Enfin, parmi les clones de *L. pneumophila* hautement résistants aux macrolides sélectionnés *in vitro*, nous avons montré que les mutations observées dans la zone promotrice de *lpp2879-2880* entraînent une augmentation de la synthèse des protéines correspondantes. Elles constituent donc un mécanisme de résistance additionnelle aux mécanismes de résistance de haut niveau aux macrolides précédemment décrits chez *L. pneumophila*.

## Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones *in vivo* : the case of *Legionella pneumophila* and humans.



M. MAURIN

Lubana SHADOUD<sup>1,2,3</sup>, Iyad ALMAHMOUD<sup>1,2,3</sup>, Sophie JARRAUD<sup>4,5,6,7</sup>, Jérôme ETIENNE<sup>4,5,6,7</sup>, Sylvie LARRAT<sup>8</sup>, Carole SCHWEBEL<sup>9</sup>, Jean-François TIMSIT<sup>10</sup>, Dominique SCHNEIDER<sup>1,2</sup>, Max MAURIN<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, LAPM, UMR5163, F-38000 Grenoble, France

<sup>2</sup> CNRS, LAPM, F-38000 Grenoble, France

<sup>3</sup> CHU Grenoble, Institut de Biologie et de Pathologie, Grenoble, France

<sup>4</sup> Université Lyon 1, CIRI, Lyon, France

<sup>5</sup> CNRS UMR5308, ENS Lyon, France

<sup>6</sup> INSERM U1111, Lyon, France

<sup>7</sup> CNR des Legionella, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>8</sup> UVHCI, UMI 3265, Univ. Grenoble Alpes, EMBL, CNRS, Grenoble, France

<sup>9</sup> CHU Grenoble, Réanimation Médicale, Grenoble, France

<sup>10</sup> INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

Legionellosis is potentially a severe pneumonia caused by Gram-negative bacteria of the genus *Legionella*. *L. pneumophila* is responsible for almost 90% of human infections, with mortality rates of 10% up to 30% in immunocompromised patients. Death may occur despite administration of an appropriate antibiotic therapy, i.e. a macrolide or a fluoroquinolone. Therapeutic failures have never been associated with development of antibiotic resistance in *L. pneumophila*. A single fluoroquinolone-resistant strain of *L. pneumophila*, harboring a gyrA83 mutation, was recently isolated in a legionellosis patient. In the present study, our goal was to demonstrate the possibility of *in vivo* selection of fluoroquinolone resistance in *L. pneumophila* in legionellosis patients treated with this class of antibiotics.

We tested 139 lower respiratory tract samples collected from 82 unrelated legionellosis patients during their hospitalization for diagnostic purposes. These samples were tested using a real time PCR assay targeting mutations occurring in the quinolone resistance determining region (QRDR) of gyrA gene, encoding the subunit A of DNA gyrase. Specifically we checked the presence of mutations at codon

positions gyrA83 and gyrA87, which we previously demonstrated to be associated with fluoroquinolone resistance in *in vitro* selected *L. pneumophila* mutants. Positive results were confirmed by PCR amplification and sequencing of *L. pneumophila* gyrA QRDR from respiratory samples. Then, for respiratory samples with confirmed gyrA83/87 mutation, the *L. pneumophila* load and the percentage of resistant mutants were determined using a combination of a qPCR test targeting the mip gene and next generation sequencing (NGS) technology.

Using such a strategy, we identified in two patients the *in vivo* selection of fluoroquinolone resistant gyrA83 mutants of *L. pneumophila* during fluoroquinolone therapy. The fluoroquinolone-susceptible population of *L. pneumophila* was almost totally replaced by a fluoroquinolone-resistant one within a few days of antibiotic therapy. In these two patients, cure was obtained under fluoroquinolone plus macrolide treatment, after prolonged hospitalization and intense care support. The true prevalence and clinical impact of such a hidden *in vivo* resistance in *L. pneumophila* should be further evaluated. It must be carefully considered in the therapeutic management of legionellosis patients.

## Détection pulmonaire chronique de *Legionella* : échecs thérapeutiques, récurrences ou réinfections ?



C. GINEVRA

GINEVRA Christophe<sup>1,2</sup>, DESCOURS Ghislaine<sup>1,2</sup>, RANC Anne Gaëlle<sup>1,2</sup>, BERAUD Laetitia<sup>1</sup>, LINA Gérard<sup>1</sup>, JARRAUD Sophie<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, France

<sup>2</sup> CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111 ; CNRS ; UMR5308, Université Lyon 1 École Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69008, France

À travers la description de 10 cas cliniques de légionellose atypiques caractérisés par la détection de *Legionella* dans les poumons sur une durée anormalement longue, nous aborderons les différentes hypothèses permettant d'expliquer la durée de ces infections (récidive, réinfection, apparition de résistance au traitement, présence d'un abcès). Ces 10 cas cliniques se caractérisent par une détection pulmonaire de *Legionella* sur une durée allant de 2 mois à 1 an, avec ou sans période d'amélioration clinique ou de guérison pendant cette période.

Au cours des investigations liées à ces cas, les isolats disponibles ont été génotypés, la résistance aux antibiotiques recherchée par des méthodes phénotypiques et/ou moléculaires, la présence d'abcès recherchée par imagerie.

Ces différentes investigations, ont permis de mettre en évidence une réinfection certaine, une réinfection possible au domicile du patient et 8 cas de persistance de *Legionella* dans les poumons sur plusieurs semaines. Aucune résistance au traitement n'a pu être mise en évidence. La présence d'un abcès rendant le traitement inefficace semble être la cause de 4 infections persistantes. Le statut immunitaire particulier de 4 patients semble être à l'origine des autres infections persistantes.

## *Legionella pneumophila* inhibe la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii*.



L. MENGUE

**Luce Laetitia MENGUE, Yann HECHARD, Ascel SAMBA-LOUAKA**

UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des Interactions. Université de Poitiers, France

**Introduction :** Les amibes libres du genre *Acanthamoeba* sont des protozoaires ubiquistes de l'environnement. Au sein de l'environnement, *Acanthamoeba* se nourrit principalement de micro-organismes par phagocytose. Seulement, certains micro-organismes ont acquit une résistance qui a pour conséquence qu'elles ne soient plus digérées par les amibes. Parmi eux, certains sont même capables de se multiplier à l'intérieur des amibes et d'en ressortir par lyse cellulaire après leur multiplication. C'est le cas de *Legionella pneumophila*, bactérie responsable de la légionellose, qui utilise son hôte naturel *Acanthamoeba castellanii* pour persister au sein de l'environnement. Plusieurs études ont montré que *L. pneumophila* a développé plusieurs mécanismes lui permettant de modifier la physiologie de son hôte amibien à son avantage. Toutefois, aucune étude n'a jusqu'à présent décrit les conséquences de cette modification sur la prolifération de *A. castellanii*.

**Objectif :** Etudier les fonctions de l'hôte *A. castellanii* perturbées suite à l'infection par *L. pneumophila*, et en particulier, l'impact de cette dernière sur la prolifération cellulaire de son hôte.

**Méthodes :** *A. castellanii* a été mise en co-culture avec *L. pneumophila* Paris à différentes multiplicité d'infection (MOI). Une condition de co-culture avec *Escherichia coli* (bactérie digérée par l'amibe) a été rajoutée comme contrôle en plus du contrôle négatif. Après ce temps de co-culture, les amibes ont été rincées puis incubées dans le milieu de croissance

PYG, complémenté en gentamicine pour tuer les bactéries non internalisées. Pendant la période d'incubation, la multiplication des amibes a été évaluée par comptage cellulaire. Pour toutes les conditions testées, la lyse cellulaire a été évaluée en mesurant la lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le milieu de croissance. Enfin, un suivi des amibes durant la période d'incubation a été réalisé par vidéo-microscopie.

**Résultats :** Les données du comptage cellulaire ont montré que le nombre de cellules *A. castellanii*, en condition de co-culture avec la bactérie *L. pneumophila*, était inférieur au contrôle pour toutes les conditions testées. Cette différence était plus d'autant plus importante que la concentration bactérienne était élevée. Pour toutes les MOI testées, nous n'avons pas détecté de LDH dans le milieu de culture, ce qui nous a permis d'exclure la lyse cellulaire comme hypothèse pour expliquer les données du comptage cellulaire. En vidéo-microscopie, une modification de nos amibes a été observée: les cellules s'arrondissaient à partir des premières heures d'incubations, perdaient leur adhérence et leur mobilité. Enfin, aucune division cellulaire n'a été observée pour ces cellules contrairement au contrôle.

**Conclusion :** Ces résultats montrent que la bactérie *L. pneumophila* empêcherait la multiplication de son hôte *A. castellanii* via un mécanisme qui est en cours d'étude.

## Role of cyclic-di-GMP signaling and nucleoid-associated proteins in the orchestration of bacterial effectors expression and delivery by the Dot/Icm secretion system during *Legionella* infectious cycle.



A. VIANNEY

**Anne VIANNEY, Julie ALLOMBERT, Claire ANDREA, Nathalie BAÏLO, Céline MICHARD, Patricia DOUBLET and Elisabeth KAY**

International Center for Infectiology Research (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard, Lyon, France

Inside host cell, *Legionella* actively manipulates cellular processes to evade endocytic degradation and trigger the biogenesis of a *Legionella*-containing vacuole (LCV), permissive for its intracellular replication. Successful bacterial infection requires a functional Icm/Dot type IV secretion system which translocates an exceptionally large repertoire of effector proteins, about 300, into the host cytosol. The synthesis and/or the kinetic of translocation of these Dot/Icm effectors have to be tightly coordinated to ensure their delivery in correct amount and at the precise timing at each step of the infection process of *Legionella*. Here, we present recent advances of our group in deciphering the transduction pathways and regulatory networks involved in this orchestration.

First, our recent works highlight the role of Nucleoid-Associated Proteins (NAPs) and specially the role of Fis proteins, in the fine-tune coordination of *Legionella* virulence factors.

Fis was highlighted as a key regulator in several pathogens to coordinate virulence gene expression. *Legionella* has three different *fis* genes, which is unique among bacteria, suggesting regulatory roles that may differ in substantial ways from that in other pathogens. We demonstrated that Fis1 and Fis2 jointly control the expression of genes encoding important virulence factors, including flagella, Dot/Icm T4SS components and its effectors, and several cyclic-di-GMP-metabolizing enzymes. The intracellular level of c-di-GMP depends on two opposite enzymatic

activities, namely diguanylate cyclase (DGC) and phosphodiesterase (PDE) activities, responsible for the synthesis and hydrolysis of this second messenger, and characterized by GGDEF and/or EAL domains, respectively. Interestingly, c-di-GMP signaling is also a potential actor of virulence control in several pathogenic species.

Our works demonstrate that among the 22 potential c-di-GMP-metabolizing enzymes of *L. pneumophila*, 3 of them are specifically involved in virulence control and particularly in the early survival during host cell infection. The secretion efficiency of Dot/Icm effectors were tested in the 3 GGDEF/EAL mutant strains thanks to an original translocation assay we developed. Each mutant strain exhibits a differentially altered translocation compared to wild-type strain. Strikingly, while translocation of some effectors remained unchanged at several time points, others appeared over- and under-translocated. These results demonstrate that these 3 GGDEF/EAL proteins finely orchestrate the translocation of various Dot/Icm effectors and this control is required for efficient infectious cycle. Overall, our results aim to shed in light the role of sophisticated and inter-connected regulatory networks in the fine-tune regulation of virulence factors at the early steps of the infectious cycle of *Legionella pneumophila*.

## Proteomics approaches to dissect T4SS effector-induced host cell signalling complexes.



G.N. SCHROEDER

**Gunnar N. SCHROEDER, Ernest C. SO, Jyoti S. CHOUDHARY, Ed W. TATE, Aurelie F. MOUSNIER, Gad FRANKEL**

Imperial College of Science, Technology and Medicine MRC Centre for Molecular Bacteriology & Infection Flowers Building, London, UK  
g.schroeder@imperial.ac.uk

The ever increasing number of genome sequences of *Legionella pneumophila* isolates and other *Legionella* species has revealed an unprecedented high number of Dot/Icm type IV secretion system (T4SS) effectors. The next challenge lies in the determination of the individual roles of these effectors during infection, which is crucial to understand strain and species specific differences in virulence and epidemiology.

As functional redundancy among numerous effectors renders functional genomics approaches to characterise effectors ineffective, the identification of their host cell targets is key. Various *in vitro* approaches such as yeast two-hybrid screens and protein pull-downs have been used to find effector targets; however these assays can deliver high rates of false positives or miss targets as they do not account for the unique microenvironment found in an infected cell. To overcome this obstacle, we developed a new tandem affinity purification (TAP) system which allows the determination of interactomes of effectors directly from infected cells. Our system relies on host cell lines expressing the biotin ligase BirA which are infected with *L. pneumophila* expressing effectors fused to a BirA-specific biotinylation (Bio) sequence and a hexahistidine-tag. Upon translocation Bio-tagged effectors become biotinylated, allowing isolation of effector-target complexes using Ni<sup>2+</sup>-NTA and Streptavidin affinity purification followed by determination of the complex composition by mass spectrometry.

Using this approach we identified the effector PieE, a multi-domain membrane protein, as new Rab GTPase binding hub on the *Legionella*-containing vacuole. Furthermore, we profiled the physiological interactors of other effectors, e.g. SidM and LidA, which were previously shown to promiscuously bind Rab GTPases *in vitro*, enabling us now to focus the functional characterisation of these effectors on the host cell signalling pathways which are relevant during infection.

## Characterization of *Legionella pneumophila* and host autophagy interaction.



V. LELOGEAIS

**Virginie LELOGEAIS<sup>1</sup>, Mathias FAURE<sup>1</sup>, Fabrice VAVRE<sup>2</sup>, Patricia DOUBLET<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon

<sup>2</sup> Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE), UMR CNRS 5558

*Legionella pneumophila* has evolved capacities to survive and replicate within phagocytic cells, as amoebas or human macrophages. In this purpose, this intravacuolar bacterium secretes a high number of Type 4 Secretion System effectors that interferes with many cellular pathways including autophagy. Autophagy is a highly conserved pathway that allows eukaryotic cells to recycle end-life cytosolic components in order to regulate cell homeostasis. Autophagy is also a degradative pathway essential to fight intracellular pathogen infections, but numerous microorganisms have evolved strategies in order to subvert this mechanism.

The interaction between *L. pneumophila* and autophagy has been reported but remains still unclear. Our experiments show that *L. pneumophila* infection induces a global stimulation of autophagy at early time post infection. Importantly, this autophagy stimulation is bacterial strain-dependent. Moreover, we also observed that inhibition of autophagy resulted in decreased intracellular bacterial proliferation, thus suggesting that host cell autophagy is beneficial for *L. pneumophila*.

## Analysis of competence in *Legionella pneumophila* uncovers a conserved family of RNA chaperone for trans-acting non-coding sRNA.



L. ATTAIECH

Laetitia ATTAIECH<sup>1</sup>, Aïda BOUGHAMMOURA<sup>1</sup>, Céline BROCHIER-ARMANET<sup>2</sup>, Ross A. EDWARDS<sup>3</sup>, Ayat OMAR<sup>3</sup>, Andrew MACMILLAN<sup>3</sup>, Mark GLOVER<sup>3</sup> and Xavier CHARPENTIER<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR 5240, Université Lyon 1, 10 rue Dubois, Villeurbanne, 69100, France

<sup>2</sup> CNRS UMR 5558, Université Lyon 1, 16 rue Dubois, Villeurbanne, 69100, France

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2H7, Canada

**M**echanisms of Horizontal Gene Transfer (HGT), such as natural transformation, are a major contributor to genetic plasticity and adaptation in bacteria and favours the emergence and dissemination of virulence traits and antibiotic resistance<sup>(1, 2, 3)</sup>. *Legionella pneumophila* is a naturally transformable bacteria, i.e. it possesses the inherent ability to enter a specialised, genetically controlled, physiological state called competence, in which it is able to internalise exogenous DNA and integrate it into its chromosome. The absence of any known competence regulators in *L. pneumophila* suggested that unusual mechanisms of regulation could be involved in this process.

Indeed, we discovered an RNA chaperone (encoded by the gene *lpp0148* in the Paris strain) and a new trans-acting non-coding sRNA that, together, control competence development in *L. pneumophila*. A  $\Delta$ *lpp0148* mutant was previously found hypercompetent<sup>(4)</sup> and our RNAseq analysis of this mutant confirmed the upregulation of genes associated with natural transformation in other bacterial species (*comEA*, *comEC*, *comM*, *comF*,...). *lpp0148* belongs to a large and widely distributed family of genes found in the core genome of many species and of unknown function. These genes encode proteins containing a FinO domain, named after the well-studied plasmid-encoded RNA chaperone FinO. FinO represses the conjugation process by facilitating the recognition between the cis-acting antisense RNA (asRNA) FinP and its mRNA target<sup>(5)</sup>. We used RNA-Immunoprecipitation coupled to deep sequencing and discovered that *lpp0148* interacts with a single

intergenic 66-nt sRNA. *lpp0148* tightly binds this sRNA *in vitro* and protects it from degradation *in vivo*. Moreover, a deletion mutant of this sRNA presents a hypercompetence phenotype identical to that of the  $\Delta$ *lpp0148* mutant. We therefore named it RocR for Repressor of competence RNA. Under specific growth conditions, a growth phase-dependent decrease in expression of *lpp0148*, and subsequently of RocR, triggers competence development and natural transformation. While during standard growth conditions, *lpp0148* and RocR post-transcriptionally repress the competence regulon genes. Thus, our results describe *lpp0148* as the first non-Hfq RNA chaperone of a multi-target sRNA that acts by base pairing.

Global phylogenetic analysis of FinO-domain containing proteins revealed that, in *L. pneumophila*, *lpp0148* results from a gene duplication event, followed by subfunctionalization to control the competence regulon. Moreover, as FinO-domain containing proteins are widely distributed amongst most beta- and gamma-proteobacteria, they could represent a previously unrecognised but well represented class of sRNA regulatory proteins.

(1) Gogarten, J. P. & Townsend, J. P. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 679–687 (2005).

(2) Barlow, M. *Methods Mol. Biol.*, 532, 397–411 (2009).

(3) Arber, W. *Life*, 4, 217–224 (2014).

(4) Sexton, J. A. & Vogel, J. P. *J. Bacteriol.* 186, 3814–25 (2004).

(5) van Biesen, T. & Frost, L. S. *Mol. Microbiol.* 14, 427–436 (1994).

## Identification du système de transformation naturelle de *L. pneumophila*.



P.A. JUAN

P-A. JUAN, L. ATTAIECH et X. CHARPENTIER

Equipe «Signalisation et Génétique de la Compétence des Bactéries Pathogènes», 10 rue Raphaël Dubois, Bat. Lwoff, 69622 Villeurbanne Cedex, France

**C**ontexte & Objectifs : La transformation naturelle est un mécanisme majeur de transfert horizontal de gènes qui joue un rôle prépondérant dans la diversification génétique des bactéries. Sous des conditions de croissance particulières, certaines bactéries sont capables d'entrer en état de « compétence » pour la transformation naturelle. Il s'agit d'un état physiologique génétiquement programmé où la bactérie exprime l'ensemble des gènes nécessaires à la mise en place d'un système d'import d'ADN exogène dont l'intégration conduit à une transformation génétique et phénotypique. *L. pneumophila*, bactérie environnementale et agent étiologique de la légionellose, fait partie des espèces naturellement transformables. Cette bactérie possède dans son génome de nombreux gènes à motifs eucaryotes, dont certains sont notamment impliqués dans sa virulence. La transformation naturelle permet à une bactérie d'intégrer des fragments d'ADN exogène libre, quelle que soit leur origine. De ce fait, elle constitue une hypothèse plausible pour expliquer l'acquisition par *L. pneumophila* de gènes étrangers ayant favorisé son adaptation aux protozoaires prédateurs et incidemment aux macrophages alvéolaires. Si certains paramètres favorisant l'entrée de *L. pneumophila* en état de compétence ont d'ores et déjà été identifiés, le système de transformation naturelle de la bactérie n'est pas connu. Le but de ce travail était de décrire les composants principaux de ce système ainsi que son rôle potentiel dans le processus infectieux de la bactérie.

**Méthodes & Résultats** : Une analyse transcriptomique par RNAseq a permis d'identifier un panel de gènes surexprimés dans un mutant hypertransformable de

*L. pneumophila* Paris. Une mutagenèse systématique de ces gènes a permis de révéler que certains d'entre eux étaient effectivement impliqués dans la transformation naturelle. En revanche, de façon cohérente avec un rôle adaptatif, ces gènes ne sont pas essentiels à la virulence. Parmi les gènes identifiés, un certain nombre sont impliqués dans la mise en place et/ou la stabilisation d'un pilus de transformation, structure fréquemment observée chez les espèces transformables. Le rôle de la protéine structurale MreB a également été étudié. Enfin, un travail mené sur un panel de 34 isolats cliniques de *L. pneumophila* a montré que la plupart étaient naturellement transformables, suggérant une relative conservation de ce mécanisme au sein de l'espèce.

**Conclusions** : Notre travail a permis d'identifier les composants principaux du système de transformation naturelle de *L. pneumophila*, qui n'est pas impliqué dans la virulence de la bactérie. Le système nécessite notamment un pilus de type IV vraisemblablement dédié au mécanisme de transformation naturelle. Ces résultats nous permettent de proposer un premier modèle du système de transformation naturelle de *L. pneumophila*. Ces progrès ouvrent la voie à une analyse plus détaillée de la dynamique du système et, plus généralement, à une meilleure compréhension des mécanismes de transformation naturelle chez les bactéries Gram-négatives.

**Mots-clés** : *Legionella pneumophila* ; transformation naturelle ; pilus de type IV.

## Détection, quantification et évaluation du pouvoir pathogène des VBNC grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux (problématique *Legionella*).

P1

### Séverine ALLEGRA

UMR 5600 Environnement Ville Société - ISTHME et GIMAP, EA 3064  
Université Jean Monnet  
Mail : severine.allegra@univ-st-etienne.fr

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 réglementation a fixé des taux d'alerte et de traitement des installations en UFC/L. La surveillance des taux de ces bactéries dans l'environnement est donc basée sur une méthode normalisée de détection et de quantification par culture (AFNOR NF T90-431). Cependant, environ 1200 cas de légionellose par an sont toujours observés en France.

Notre équipe participe depuis 2006 au projet : « amélioration des méthodes de détection et de quantification des légionelles ». Les financements successifs de l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire), de l'Université Jean Monnet et de la région Rhône-Alpes (ADR) nous ont permis, entre autre, de développer des tests de cytométrie en flux pour :

- détecter et quantifier les légionelles VBNC dans un échantillon monomicrobien <sup>(1)</sup> ou polymicrobien (recherches en cours).
- caractériser l'état physiologique des légionelles et la proportion de ces états lors d'un stress thermique <sup>(2, 3)</sup>.
- étudier la résistance des *Legionella* aux traitements de décontamination (choc thermique et choc chloré) et par conséquent de pouvoir proposer des traitements optimisés des réseaux d'eaux contaminés <sup>(2-4)</sup>.

- évaluer le pouvoir pathogène des légionelles vis-à-vis de cellules de la muqueuse respiratoire humaine (macrophages et cellules épithéliales transformées et macrophages isolés de sang périphérique) <sup>(3-5)</sup>.

La cytométrie en flux a donc permis de faire de grandes avancées dans la prévention du « risque *Legionella* ». Mieux cibler les actions préventives ou curatives à mettre en œuvre pour éviter la recolonisation rapide des circuits après un traitement. Optimiser la quantification des légionelles viables et potentiellement pathogènes. L'étude se porte à présent sur les aérosols de légionelles qui sont les seuls responsables de la pathologie...

<sup>1</sup> Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B, Riffard S. 2008. Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. Appl. Environ. Microbiol. 74:7813-7816.

<sup>2</sup> Allegra S, Grattard F, Girardot F, Riffard S, Pozzetto B, Berthelot P. 2011. 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. 77:1268-1275.

<sup>3</sup> Epalle T, Girardot F, Allegra S, Maurice-Blanc C, Garraud O, Riffard S. 2015. Viable but Not Culturable Forms of *Legionella pneumophila* Generated After Heat Shock Treatment Are Infectious for Macrophage-Like and Alveolar Epithelial Cells After Resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*. Microb. Ecol. 69:215-224.

<sup>4</sup> Pascale Mustapha, Thibaut Epalle, Séverine Allegra, Françoise Girardot, Olivier Garraud, Serge Riffard. 2015. Monitoring of *Legionella pneumophila* viability after chlorine dioxide treatment using flow cytometry. Res. Microbiol. in press.

<sup>5</sup> Séverine Allegra, Françoise Girardot, Serge Riffard. 2015. Infection profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells by *Legionella pneumophila* Viable But Non Culturable cells. En cours d'écriture.

## Rôle des supports et de la température sur le phénomène d'adhésion et la formation de biofilm par *Legionella pneumophila* et *Pseudomonas aeruginosa* dans les systèmes de distribution des eaux.

P2

**A.ASSAÏD<sup>1,2</sup>, E.MLIJI<sup>2</sup>, A.BARGUIGA<sup>2</sup>, K.NAYME<sup>2</sup>, H.ENNAJI, M.TIMINOUNI<sup>2</sup>, H.LATRACHE<sup>1</sup>, N.ELMDAGHRI<sup>2</sup>, M.ELLOUALI<sup>1</sup>**

assaidi1@gmail.com

<sup>1</sup> Laboratoire de bioprocédés et bio-interface, Faculté des sciences et techniques Béni-Mellal, Maroc

<sup>2</sup> Laboratoire de la microbiologie des eaux et hygiène d'environnement, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca

*Legionella pneumophila*, l'agent étiologique de 90% des cas de la légionellose, est une bactérie à Gram négatif d'origine hydrotellurique retrouvée aussi bien dans les environnements naturels (lacs, rivières) que dans les environnements artificiels (tours aéroréfrigérantes, réseaux d'eau chaude sanitaire...), où elle est en mesure de former les biofilms. Ces biofilms représentent un réseau complexe d'interactions métaboliques et architecturales, qui emprisonnent les nutriments et constituent un réservoir alimentaire mais aussi une protection face à diverses agressions biologiques, chimiques et physiques. *Legionella pneumophila* a la capacité d'adhérer et de former des biofilms dans les systèmes de distribution d'eau en fonction des conditions environnementales. Les matériaux des systèmes de distribution d'eau se comportent différemment vis-à-vis aux phénomènes d'adhésion et formation de biofilm bactérien. L'objectif de notre étude est de déterminer la cinétique d'adhésion et de formation des biofilms par *L.pneumophila*, séro-groupe 1, séro-groupe 2-15 et *Pseudomonas aeruginosa* sur cinq matériaux couramment utilisés dans les systèmes de distribution d'eau à savoir le polystyrène, Acier galvanisé, Polypropylène, PVC et le cuivre, et ceci à trois températures de croissance 20°C, 37°C et 44°C. *L. pneumophila* séro-groupe 2-15 et *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une grande capacité que *L.pneumophila* séro-groupe 1 d'adhérer et de former le biofilm sur la majorité des matériaux testés à 37°C qu'à 20°C et 44°C. Le cuivre n'a montré aucune adhésion et formation de biofilm ; il serait parmi les matériaux reconnu comme inhibiteurs de l'installation bactérienne. La compréhension de ces mécanismes

s'inscrit dans l'objectif de la maîtrise des risques des contaminations de ces surfaces et la sélection des matériaux de la conduite d'eau appropriés capables de minimiser la possibilité de développement de biofilms polymicrobiens dans les systèmes de distribution d'eau et la limitation des infections par les bactéries pathogènes.

**Mots clés :** *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, adhésion, biofilm, supports.

## Single nucleotide genome editing in *Legionella pneumophila*.

P3

**Nathalie BAILO, Xavier CHARPENTIER, Annelise CHAPALAIN, Elisabeth KAY, Anne VIANNEY, Patricia DOUBLET, Christophe GILBERT**

International Center for Infectiology Research (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard, Lyon, France

In recent years, many genetic protocols have been designed to create deletions or mutations in bacterial chromosome. However, most of these published techniques need to antecedently alter the bacterial genetic content, for example by introducing a plasmid expressing a recombinase, and even markerless strategies often leave a few nucleotides scar on the bacterial chromosome<sup>(1, 2)</sup>. One of the most advanced method was described in *Bacillus subtilis*<sup>(3)</sup> using *mazF* (toxin encoding gene) as a counter-selectable marker. Using a similar *mazF* based method, we generated a genetic toolbox for genome editing in *Legionella pneumophila*. In this work, we clearly demonstrated the efficiency of a two-step protocol to generate clean scar-free deletions in *L. pneumophila* chromosome. Moreover, we could efficiently generate single nucleotide mutation in *Legionella* chromosome as well as transcriptional or translational fusions. Examples of Green Fluorescent Protein (GFP) expression fusions in these two last cases showed the power of such tools to follow a target gene expression during the bacterial life cycle. To our knowledge, this is the first description of genetic tools usable in unaltered *Legionella pneumophila* that enable clean unmarked chromosome manipulation from one single nucleotide change to insertion or deletion of long sequences. This method also permits the generation of multiple deletions (or mutations) along the chromosome with no experimental limit (such as the choice of a marker...) as no trace of exogenous material or marker is present in the final mutant clone. As the

method takes advantage of the conserved natural transformability of *L. pneumophila* it should allow genome editing of most clinical isolates.

<sup>1</sup> Khetrpal V et al. 2015. *Nucleic Acids Research* 43:13.

<sup>2</sup> Zhang XZ et al. 2006. *Nucleic Acids Research* 34: 9.

<sup>3</sup> Bryan A et al. 2011. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2545-2548.

## Identification par spectrophotométrie de masse Maldi - Tof (Brucker®) d'espèces de *Legionella*, autres que *Legionella pneumophila* isolées à Paris et dans sa banlieue limitrophe. P4

Olivier CHALLEMEL<sup>1</sup>, Martine ADNANE<sup>1</sup>, Cécile BOUDRY<sup>2</sup>, Anaïs PETIT<sup>2</sup>, Irène MAFFRE<sup>3</sup>, Sophie JARRAUD<sup>3</sup>, Christine LAWRENCE<sup>2</sup>, Françoise ENKIRI<sup>1</sup> et Damien CARLIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris, Bureau de Santé Environnementale et d'Hygiène, 11 rue George Eastman 75013 Paris

<sup>2</sup> Équipe Opérationnelle d'Hygiène, AP-HP, CHU Raymond Poincaré 104 boulevard Raymond Poincaré 92380 Garches

<sup>3</sup> Centre National de Référence des *Legionella*, Université de Lyon, INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier, Université Lyon 1, IFR128, and Hospices Civils de Lyon, Lyon

Depuis les années 1980 le laboratoire d'hygiène de la ville de Paris (LHVP) a conservé de nombreuses souches de *Legionella*, issues de l'environnement. Ces souches proviennent essentiellement de tours aérofrigorifères (TAR) et de réseaux d'eaux chaudes sanitaires (ECS) localisés dans les différents arrondissements de Paris et de sa banlieue limitrophe. *L. pneumophila* est le plus souvent isolée de l'environnement et en pathologie humaine. Une 1<sup>re</sup> étude a été menée sur les souches de cette espèce et a montré que *L. pneumophila* SG1 souche « Paris » était la plus fréquente dans notre collection. En 2015, le LHVP s'est intéressé aux autres espèces et à leur identification, les souches de l'environnement étant rarement typées en France. L'identification de ces souches a été conduite par spectrométrie de masse Maldi-Tof (Brucker®). Notre objectif était également de déterminer la répartition géographique de ces espèces sur Paris.

Sur les 158 souches analysées, 69% des isolats ont pu être identifiés de façon certaine à l'espèce, 15,2% ont donné une identification acceptable au genre et 15,8% n'ont pu être reconnues. Ces dernières souches ont été transmises au CNR de Lyon pour identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Biomérieux Vitek MS) à l'aide de la RUO (Research Use Only) database de Saramis (BioMérieux).

Les populations isolées dans l'eau des TAR et dans les ECS semblent différentes. Ainsi, l'espèce *L. parisiensis* n'a été détectée que dans les eaux de TAR ; ce résultat est en adéquation avec les données de l'unique cas clinique publié en France en 1997 dont la souche responsable

avait été isolée d'une eau de TAR. L'espèce *L. anisa* a été majoritairement retrouvée dans l'eau chaude sanitaire et ceci sur l'ensemble des arrondissements de Paris. Les espèces *L. rubrilucens* et *L. erythra* font partie des principales autres espèces identifiées. Enfin, d'autres souches ont été mises en évidence mais de façon sporadique. Il n'a pas été détecté de prévalence d'une espèce sur l'ensemble des 20 arrondissements de Paris. Toutefois, il a été noté la persistance sur plusieurs années d'une même espèce sur un même site.

En conclusion, la spectrométrie de masse apparaît discriminante pour identifier des espèces de *Legionella* les plus courantes, autres que *pneumophila*. L'absence d'identification de certains isolats est vraisemblablement liée à l'absence de l'espèce ou à un trop faible nombre de profils de souches d'une même espèce dans la base de données. Cette technologie apparaît prometteuse pour être utilisée dans l'avenir dans l'identification d'espèces bactériennes de l'environnement en s'affranchissant des techniques d'identification microbiologiques biochimiques, immunologiques ou de biologie moléculaire. Les différences observées concernant les espèces de *Legionella* spp entre l'eau des TAR et celle des réseaux d'ECS sont probablement dues à la spécificité du biofilm constitué dans ces équipements en raison de la nature même de chaque dispositif, des traitements biocides appliqués, de la vétusté plus importante et de la conception plus variée des réseaux... Cette étude apporte quelques informations sur la répartition des souches sur Paris mais elle mériterait d'être étendue à un plus grand nombre d'échantillons pour affiner ces premières conclusions.

## Validation of the VITEK® MS IVD and RUO databases for *Legionella* species identification. P5

DAUWALDER Olivier<sup>2</sup>; OTTAVIANI Rehane<sup>2</sup>; MAFFRE Irène<sup>2</sup>; MICLOT Alexandra<sup>2</sup>; DE RESPINIS Sophie<sup>5</sup>; MONNIN Valérie<sup>4</sup>; MAILLER Sandrine<sup>4</sup>; WELKER Martin<sup>4</sup>; DURAND Géraldine<sup>4</sup>; GAIA Valeria<sup>3</sup>; GIRARD Victoria<sup>4</sup>; JARRAUD Sophie<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> National Reference Center of *Legionella*, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

<sup>3</sup> Servizio di microbiologia EOLAB, Swiss National Reference Center for *Legionella*, Bellinzona, Switzerland

<sup>4</sup> bioMérieux, Route de Port Michaud, 38390 La Balme Les Grottes, France

<sup>5</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Bellinzona, Switzerland

**Objectives :** Identification of *Legionella* species is challenging and requires fastidious reference methods. MALDI-TOF MS can therefore be of great interest, allowing the rapid identification of all *Legionella* species with one single method. This study describes the validation of the MALDI-TOF MS systems VITEK® MS IVD and RUO databases for *Legionella* identification.

**Methods :** The VITEK® MS IVD V3.1 and RUO SARAMIS databases V4.14 were build using 156 well characterized *Legionella* strains belonging to 25 species from the Swiss National Reference Center (NCR). Those two databases were then evaluated using 126 external *Legionella* strains belonging to 15 species from the French NRC and identified by *mip* sequencing. The strains were cultivated on both GVPC and BCYE to compare performance on both media. In case of discrepancies or lack of identification, only one retest was performed

**Results :** The global percentages of correct identification to the species level obtained on the IVD and RUO databases were 92% and 94.8% respectively for strains subcultured on GVPC, and 86% and 92.0% respectively for strains subcultured on BCYE. In RUO mode, with the exception of *L. gormanii*, *L. feelei* and *L. micdadei* that could be identified to the species level in 40%, 92.3% and 95.5 % of the cases respectively, all the other strains of *Legionella* species were correctly identified. The

results obtained in IVD mode were similar. However, 9 misidentifications were obtained with IVD database versus 4 with RUO database.

**Conclusions :** This study shows that VITEK MS allows a rapid and accurate identification of *Legionella* species.

**Keywords:** *Legionella*, MALDI-TOF mass spectrometry, VITEK® MS, SARAMIS, identification

## Complete Genome Sequences of 3 *Legionella pneumophila* isolates Using PacBio Single-Molecule Real-Time Sequencing Technology.

P6

**Christophe GINEVRA<sup>1,2</sup>, Ghislaine DESCOURS<sup>1,2</sup>, Marine VANDEWALLE<sup>2</sup>, Laetitia BERAUD<sup>1</sup>, Anne-Gaëlle RANC<sup>1,2</sup>, Gérard LINA<sup>1,2</sup> and Sophie JARRAUD<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>National Reference Centre for *Legionella*, Hospices Civils de Lyon, France

<sup>2</sup>CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, France

**O**bjective : To assess the PacBio Single-Molecule Real-Time Sequencing Technology for the comparison of *Legionella pneumophila* genomes.

**Method** : Three *L. pneumophila* clinical isolates were selected from the laboratory collection: 1 ST23 isolate (the most prevalent ST in France during the last decade) and 2 ST48 isolates (isolated 6 weeks apart from a patient with a severe Legionnaires' disease case). The 3 *L. pneumophila* genomes were sequenced using PacBio Single-Molecule Real-Time Sequencing technology. Sequence assemblies were performed using the SMRTportal pipeline. The HGAP3 algorithm was used to assemble long reads after their correction by short reads from the same dataset. The assembled genomes were annotated by the MAGE platform and compared using MAUVE software. CRISPRFinder software was also used to look for CRISPR in the sequences.

**Results** : One 3.5 Mbp contig could be assembled from the sequencing data for all isolates. The circular chromosome of each isolate could be deduced from these 3 large contigs. A complete type II CRISPR/cas system could be identified in the ST48 isolates. Three putative integrative and conjugative elements (ICE) were identified in each genome but only one was partially shared by the 2 STs. The major difference between the 2 ST48 genomes was the detection of both integrated and excised form of one ICE in the 2<sup>nd</sup> isolate whereas only the integrated form was detected in the 1<sup>st</sup> isolate.

**Conclusion** : PacBio sequencing allows rapid genome sequencing of *L. pneumophila* isolates. Genomes could be easily closed allowing an accurate comparison of isolates based on their complete genomes.

## Hospital-acquired Legionnaires' disease cases confirmation using microbeads-based spoligotyping.

P7

**Nathalie JACOTIN<sup>1-6</sup>, Christophe GINEVRA<sup>1-6</sup>, Laetitia BERAUD<sup>6</sup>, Ghislaine DESCOURS<sup>1-6\*</sup> and Sophie JARRAUD<sup>1-6</sup>**

<sup>1</sup> CIRI, International Center for Infectiology Research, *Legionella* pathogenesis Team, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup> Inserm, U1111, Lyon, France

<sup>3</sup> Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup> Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France

<sup>5</sup> CNRS, UMR5308, Lyon, France

<sup>6</sup> Centre National de Référence des légionelles, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

\*Presenting author

**O**bjectives : Investigation of 2 Legionnaires' disease (LD) cases for 2 patients hospitalised in a same French hospital during April 2014 and suspected to be hospital-acquired cases.

**Methods** : Typing of *Legionella pneumophila* isolates of patients by PFGE, SBT, MAb subgrouping and microbeads-based spoligotyping.

**Results** : The 2 clinical isolates were *Legionella pneumophila* serogroup 1, pulsotype Paris, ST1, MAb subgroup Philadelphia. The spoligotype of these 2 isolates was found to be the same: SPT34. When comparing this spoligotype to our database of about 400 isolates, SPT34 was also found in one clinical strain isolated in 2009 from a patient of the same hospital. Isolates recovered from environmental investigations performed in 2009 and 2014 were also Lp1, pulsotype Paris, ST1, MAb subgroup Philadelphia and spoligotype SPT34.

**Conclusions** : Spoligotyping of the 2 clinical isolates helps to demonstrate the common origin of these 2 isolates. Their Comparison to our spoligotypes databases allows to link these cases to another LD case occurred in the same hospital 5 years ago. Environmental investigations allows to identify isolates with the same spoligotype recovered from the tap

water of the patients' rooms in both 2009 and 2014, confirming the hospital-acquired infections for these patients. In the future, we aim to create a larger spoligotypes database by conducting a European study.

## La spectrométrie de masse peut-elle être utilisée pour identifier *Legionella pneumophila* dans l'eau ?

P8

**Margaux LEPAINTEUR, Anaïs PETIT, Jean-Louis HERRMANN, Christine LAWRENCE**

Laboratoire de microbiologie, Groupe Hospitalier Universitaire Paris Ile-de-France Ouest, APHP, site Raymond Poincaré, Garches.

**Introduction :** L'identification des légionelles dans l'eau selon la norme T90-431 (2014) nécessite des tests culturels et des tests immunologiques courts et longs. D'autre part, certaines souches de légionelles auto-agglutinables ne sont pas identifiables par immuno-agglutination. La spectrométrie de masse est une technique de plus en plus utilisée pour l'identification des bactéries en laboratoire de microbiologie et permet un résultat rapide et simple. Elle a été publiée sur des séries de souches de légionelles de collection (Moliner et al 2010, Fujinami et al 2010) Cependant, cette méthode n'est pas encore validée pour l'identification de *L. pneumophila* dans l'eau.

**Objectifs :** Cette étude a pour but d'évaluer la possibilité d'identifier *Legionella pneumophila* dans l'eau par spectrométrie de masse Maldi-TOF (Brucker®) et de valider cette méthode.

**Méthodes :** Deux souches de références de *Legionella pneumophila* et deux souches de *L. pneumophila* séro-groupe 1 endémiques en France ont été identifiées par Maldi-TOF en tenant compte de trois paramètres :

- variabilité du milieu (cultures obtenues sur milieu GVPC, sur milieu BCYE et sur filtre déposé sur milieu GVPC),
- vieillissement des cultures (cultures sur chaque milieu identifiées à J3, J5 et J10),
- répétabilité de la technique (chaque souche testée 10 fois sur chaque milieu à J3)

A la suite de ces tests, 86 souches de *L. pneumophila* isolées au laboratoire selon la norme T90-431 2003 et provenant de huit hôpitaux différents d'Ile-de-France ont été identifiées à l'aide du Maldi-TOF, chaque souche étant testée 3 fois à la suite.

**Résultats :** Les tests de variabilité et de vieillissement montrent que l'identification par Maldi-TOF doit être réalisée sur des cultures jeunes (J3 ou J5) quel que soit le milieu. La répétabilité de la technique (qualité du dépôt) doit amener à réaliser au moins 3 dépôts pour une souche de légionelle à identifier. Les 3 milieux testés ont des caractéristiques équivalentes y compris la culture sur filtre qui semble un peu meilleure à J3. Dans ces conditions, l'identification au Maldi-TOF des 86 souches de *L. pneumophila* montre une spécificité de 99% avec seulement 1 souche présentant un score <2 sur les trois puits testés. Parmi les 86 souches testées, 60 (70%) avaient un score >2 les trois fois, 21 (24%) un score >2 2 fois, 4 (5%) avaient 1 fois un score >2. Une seule souche avait trois fois un score entre 1,7 et 2.

**Discussion :** Les résultats de cette étude sur des souches environnementales de *L. pneumophila* permettent de valider la méthode d'identification par spectrométrie de masse Maldi-TOF de Brucker®. La qualité du dépôt sur chaque puits étant critique pour l'identification, il est important de multiplier les dépôts en cas de score <2. Cette méthode pourrait être appliquée lors de défaut d'identification par méthodes usuelles (auto-agglutination ou absence d'agglutination par exemple) voire en remplacement des caractères culturels et de l'immuno-analyse. Pour cela, une évolution de la norme T90-431 est nécessaire afin de répondre à la réglementation. Par ailleurs, en l'état, la spectrométrie de masse ne permet pas d'identifier les sérogroupes de *L. pneumophila* en l'absence de profils de spectrométrie spécifiques de sérogroupes. Enfin, cette étude ne permet pas de valider la technique pour les espèces de *Legionella* autres que *L. pneumophila*.

## Identification de composés volatiles bactériens actifs sur *L. pneumophila*.

P9

**Clémence LOISEAU<sup>1</sup>, Ségolène DEPAYRAS<sup>1</sup>, Jean-Marc BERJEAUD<sup>1</sup>, Julien VERDON<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Université de Poitiers, Ecologie & Biologie des Interactions, CNRS UMR7267 Equipe Microbiologie de l'eau, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers cedex 9, France

clemenceloiseau@univ-poitiers.fr

**L.** *pneumophila* est l'agent pathogène responsable de la légionellose, une pneumonie mortelle dans 10 % des cas. Elle est naturellement présente dans les milieux aqueux naturels et artificiels. Le contrôle de sa prolifération dans les réseaux artificiels fait appel à l'usage de biocides chimiques ayant un fort impact sur l'Homme et l'environnement. Actuellement, les stratégies de recherche de nouveaux biocides s'orientent vers la sélection de molécules naturelles et biodégradables. Des premiers travaux nous ont permis de mettre en évidence l'activité anti-*Legionella* de bactéries du genre *Pseudomonas*, liée, en particulier, à la sécrétion de molécules volatiles. L'objectif de l'étude présentée est d'identifier la (ou les) molécule(s) volatile(s), produite(s) par *P. fluorescens* MFE01 et responsable(s) de l'activité anti-*Legionella*, ainsi que leur voie de production. Par comparaison entre les produits sécrétés par la souche MFE01 et un mutant non producteur, deux composés d'intérêts ont été détectés et identifiés par GC-MS, le 1-undécène et le 2-nonanone et dont l'activité anti-*Legionella* a été confirmée par des tests d'interaction. L'analyse génétique d'un mutant non producteur a montré que la mutation concerne un gène codant la sous unité I de l'antranilate synthase. D'autres mutants de la souche MFE01 non producteurs sont en cours d'études ainsi que les effets sur *L. pneumophila*.

**Mots-Clés :** *Legionella pneumophila*, Anti-*Legionella*, volatile, *Pseudomonas*.

## Distribution des CMI des souches de *Legionella pneumophila* résistantes et sensibles aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine. P10

MASSIP C<sup>a-b</sup>, REYNAUD JV<sup>a</sup>, CHARAVIT J<sup>a</sup>, BILLY PA<sup>a</sup>, ALMAHMOUD I<sup>c</sup>, BERAUD L<sup>a</sup>, RANC AG<sup>a-b</sup>, BOISSET S<sup>c</sup>, MAURIN M<sup>c</sup>, GINEVRA C<sup>a-b</sup>, LINA G<sup>a-b</sup>, JARRAUD S<sup>a-b</sup>, DESCOURS G<sup>a-b</sup>

<sup>a</sup> Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, 59 Bd Pinel, 69677 Bron Cedex, France

<sup>b</sup> CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Bactériologie, CHU de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble

**O**bjet de l'étude : *L. pneumophila* (Lp) est décrite comme constamment sensible aux macrolides, aux fluoroquinolones (FQ) et à la rifampicine. Cependant, des mutants résistants sont aisément sélectionnés *in vitro* et les mécanismes moléculaires ont été décrits : pour les FQ (*gyrA* puis *gyrB* et/ou *parC*), les macrolides (protéines L4/L22, ARNr 23S) et la rifampicine (*rpoB*). Notre objectif était de décrire la distribution des CMI de souches sensibles et résistantes par une technique standardisée.

**Méthodes** : Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des classes d'antibiotiques recommandés dans le traitement de la légionellose ont été déterminées par microdilution pour 109 souches cliniques de Lp et 2 souches de référence.

Les distributions des CMI ont été comparées à celles de lignées résistantes sélectionnées *in vitro* par pression antibiotique croissante de FQ (8), de macrolides (12) ou de rifampicine (10).

**Résultats** : Aucune souche résistante n'a été détectée parmi les 111 testées. Les CMI les plus basses étaient obtenues pour la rifampicine (0,00012–0,001 mg/L), puis les FQ (0,008–0,064 mg/L). Parmi les macrolides, la clarithromycine présentait les CMI les plus basses (0,004–0,064 mg/L), puis l'érythromycine (0,03–1 mg/L) et l'azithromycine (0,016–2 mg/L). Toutes les CMI obtenues par microdilution étaient inférieures ou égales à celles obtenues en diffusion par E-test sur

géluse BCYE (Bruin *et al.*, 2012).

Les CMI des mutants hautement résistants à la moxifloxacin, à l'érythromycine et à la rifampicine, étaient au moins 256 fois supérieures à celles des souches sensibles. Les souches présentant des mutations dans *gyrA* avaient des CMI intermédiaires aux FQ. Les souches présentant des gènes codant les protéines L4 et/ou L22 mutés avaient des CMI pour l'azithromycine qui chevauchaient celles de la population sauvage (1-16 vs 0,016-2 mg/L).

**Conclusion** : Les souches de Lp résistantes aux FQ, aux macrolides ou à la rifampicine peuvent être distinguées des souches sauvages par microdilution, à l'exception des souches résistantes aux macrolides par mutations dans les gènes codant L4 / L22. Bien que plus fastidieuse que la méthode par diffusion, cette technique est probablement plus représentative des concentrations d'antibiotiques atteintes *in vivo* car elle s'affranchit du problème de chélation par le charbon du milieu BCYE.

## Investigation de cas groupés de légionellose liés à un séjour dans un établissement de tourisme dans l'Indre. P11

L MENUDIER<sup>1</sup>, D BLANCHARD<sup>2</sup>, G GAUDINAT<sup>2</sup>, G SOUET<sup>2</sup>, R PARKER<sup>2</sup>, S LEPELTIER<sup>2</sup>, N ROCHE<sup>3</sup>, F DURANDIN<sup>3</sup>, D JEANNEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cire Centre-Val De Loire (CVL)

<sup>2</sup> Agence régionale de santé du CVL – Service santé environnement (SSE) et Délégation territoriale de l'Indre (DT36)

<sup>3</sup> Agence régionale de santé du CVL – CVAGS

**E**n région Centre-Val de Loire, 514 cas de légionellose ont été déclarés de 2000 à 2014 et depuis 2011, 43 cas en moyenne par an. Tous les cas font l'objet d'une enquête pour identifier les expositions à risque, rechercher d'autres cas liés à ces expositions, et mettre en place des mesures de contrôle et de prévention. Les investigations rapides et systématiques des cas ont probablement contribué à limiter le nombre de cas groupés.

Entre le 10 mars et le 19 juin 2015, l'Agence régionale de santé (ARS) Centre Val de Loire (CLV) a réceptionné, 3 déclarations obligatoires (DO) de légionellose avec une notion de séjour dans un même établissement de tourisme dans le département de l'Indre. Cet établissement avait été notifié 2 fois pour des cas groupés dans le cadre de la surveillance européenne des cas de légionellose liés au voyage ELDSNet.

L'objectif des investigations était de décrire l'épisode, de préciser la source de contamination et de s'assurer de la mise en place des mesures de contrôle au sein de l'établissement.

Les cas de légionellose avaient été déclarés dans le cadre des DO et notifiés au réseau ELDSNet. Si un prélèvement respiratoire bas était disponible, il était adressé au CNR pour culture, caractérisation de la souche et éventuelle comparaison avec les souches environnementales. Une enquête environnementale a été effectuée dans l'établissement par l'ARS qui recherchait également d'autres sources d'exposition communes.

Au total 10 cas ont été diagnostiqués par une antigénurie positive ; une seule souche clinique à *Legionella pneumophila* sérotype 1 a été isolée pour un cas et uniquement un Sequence type (ST) a pu être précisé. Les dates de début des signes pour l'ensemble des 3 clusters de 2004, 2011 et 2015 se répartissaient entre le 23 août

2002 et le 19 juin 2015. Aucun décès n'a été répertorié. Les cas étaient domiciliés dans différentes régions et avaient tous fréquenté le même établissement de tourisme en région CVL. Les résultats des autocontrôles ne montraient aucune contamination en légionelles au niveau du réseau d'eau sanitaire de l'établissement ou dans les systèmes des Tars en fonctionnement à proximité des domiciles des cas.

L'inspection dans l'établissement de tourisme avec des contrôles inopinés du réseau d'eau sanitaire a révélé la contamination en légionelles sur plusieurs points d'eau chaude et 12 souches *Legionella pneumophila* sérotype 1 ont pu être ainsi isolées. Leur comparaison avec la souche clinique a révélé un profil génétique identique : profil PFGE Louisa, ST23, sous-groupe France/Allentown. Ce résultat était compatible également avec le ST disponible (ST23). Face à ce constat, un arrêté préfectoral a été pris afin d'imposer à l'établissement, la mise en œuvre sans délai de mesures de sécurité sanitaire complémentaires contre la légionellose. Des filtres temporaires anti-légionelles ont été installés sur l'ensemble des points d'usage d'eau générant des brouillards fins. Ces mesures de contrôles mises en place ont été effectives dans les jours qui ont suivi l'inspection. En complément, un audit de l'ensemble du réseau d'ECS a été diligenté afin de mettre en place les mesures de contrôle et prévention efficaces sur le long terme.

**Conclusion** : Cet établissement a fait l'objet de 3 cas groupés ces 10 dernières années. Au cours de ce dernier épisode en 2015, les investigations épidémiologiques, environnementales et microbiologiques ont permis enfin d'identifier que le réseau d'eau était la source probable de contamination impliquant ainsi la planification de mesures de contrôle et prévention efficaces sur le long terme.

## Legionella pneumophila : Contamination massive de l'eau d'une unité de soins localisée uniquement sur les éléments périphériques du réseau.

P12

CHEFSON-GIRAULT C.<sup>1</sup>, GOURICHON L.<sup>1</sup>, PESTEL-CARON M.<sup>2</sup>, THIBERVILLE L.<sup>3</sup>, BERAUD L.<sup>4</sup>, RANC A.G.<sup>4</sup>, NOUVELLON M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'hygiène Hospitalière, Rouen France

<sup>2</sup> Laboratoire de bactériologie, Rouen, France

<sup>3</sup> Clinique pneumologique, Rouen, France

<sup>4</sup> Centre National de Référence des Légionelles, Lyon, France

Un cas fatal de légionellose nosocomiale survenu en août 2010 chez un patient profondément immunodéprimé nous a conduit à mener une vaste enquête environnementale.

Les souches de *Legionella pneumophila* (Lp) sérotype 8 isolées dans les prélèvements respiratoires du patient et dans l'eau du lavabo de la chambre où il était hospitalisé étaient identiques. Les prélèvements d'eau réalisés dans la douche du patient ne montraient pas de présence de *Legionella*. Par ailleurs cette douche a été équipée d'un filtre terminal depuis le début du séjour du patient.

Ce cas nosocomial nous a conduit à réaliser une vaste enquête environnementale dans le service en question.

Une série de 44 prélèvements d'eau chaude et eau froide, à partir à la fois des douches et des robinets a été réalisée, montrant une contamination importante du réseau à Lp (29 des points d'eau prélevés étaient positifs à une concentration comprise entre 250 et 10000 UFC/L). Cependant, l'analyse de l'eau chaude et de l'eau froide de la boucle du réseau ainsi que l'eau de la canalisation en amont du lavabo n'ont pas permis de mettre en évidence de Lp. Une contamination localisée dans les éléments périphériques a donc été évoquée.

Enfin, l'extérieur des éléments de plomberie était très entartré pouvant favoriser la création de biofilm.

Il a été décidé de procéder à un changement complet de toutes les robinetteries des 43 chambres du service. Pour évaluer l'efficacité de cette mesure 192 prélèvements ont été effectués après le changement sur tous les points d'eau et tous ont retrouvé une culture de *Legionella* négative.

Aucun traitement complémentaire n'a été réalisé sur le réseau d'eau chaude, ni choc thermique ni choc chloré.

Le réseau, surveillé tous les semestres depuis cet épisode, s'est normalisé durablement grâce à un entretien régulier des points d'eau associant détartrage et désinfection ainsi que des purges sur les douches inutilisées.

Le cas rapporté ici confirme l'importance de l'entretien des points distaux dans la prévention de la légionellose. Il rappelle également que la douche n'est pas l'unique mode de contamination: chez les patients profondément immunodéprimés, les aérosols du robinet de lavabo ou l'inhalation d'eau lors de sa consommation peuvent être contaminants.

## Comparaison des limites de détection de 3 tests de détection d'antigène urinaire par l'utilisation de lipopolysaccharide extrait de Legionella pneumophila sérotype 1 à 15.

P13

RANC Anne-Gaëlle<sup>1,2</sup>, CARPENTIER Margot<sup>1</sup>, BERAUD Laetitia<sup>1</sup>, DESCOURS Ghislaine<sup>1,2</sup>, GINEVRA Christophe<sup>1,2</sup>, Julien VERDON<sup>3</sup>, Jean-Marc BERJEAUD<sup>3</sup>, LINA Gérard<sup>1,2</sup>, JARRAUD Sophie<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, France

<sup>2</sup> CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111 ; CNRS ; UMR5308, Université Lyon 1 ; École Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69008, France

<sup>3</sup> Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe Microbiologie de l'eau, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073, Poitiers Cedex 9, France

**Objectifs :** Le lipopolysaccharide (LPS) de *Legionella pneumophila* (Lp) a un fort degré de diversité et permet la classification des Lp en différents sérogroupes et sous-groupes (mAb). Ce LPS constitue aussi le composant majeur détecté par les tests d'antigènes urinaires. Le but de cette étude est de comparer les seuils limites de détection de trois tests d'antigène urinaire par l'utilisation de LPS extraits à partir de souches de différents sérogroupes et sous-groupes de Lp.

**Matériels et Méthodes :** Le LPS de 23 souches de référence de Lp (15 souches ATCC Lp1 à Lp15 et 9 souches de chaque sous-groupe de Lp1) a été extrait de cultures pures selon une technique modifiée de Lück *et al.*, 2013. Un pool d'urines négatives a été surchargé par des concentrations déterminées de LPS (dosage du sucre interne KDO) puis ces urines diluées en série au dixième ont été testées par 3 tests de diagnostics urinaires afin de déterminer la limite de détection intrinsèque : BinaxNOW<sup>®</sup> *Legionella*, Binax<sup>®</sup> *Legionella* EIA et Sofia<sup>®</sup> *Legionella* FIA.

**Résultats :** Pour les 15 sérogroupes, les limites de détection sont très variables en fonction du test urinaire mais peuvent être de 10 à 100 000 fois plus élevées que pour les Lp1 suivant le LPS concerné. Le test BinaxNOW<sup>®</sup> détecte seulement 3 sérogroupes alors que les tests Sofia<sup>®</sup> FIA et Binax<sup>®</sup> EIA sont capables de détecter tous les sérogroupes (sauf Lp10 pour Sofia<sup>®</sup> FIA), avec des limites de détection similaires. Le sérotype 15 n'est détecté

par aucun des 3 tests. Pour les sous-groupes de Lp1, les limites de détection sont similaires pour les trois tests, avec cependant une meilleure détection pour Sofia<sup>®</sup> FIA et Binax<sup>®</sup> EIA par rapport au test BinaxNOW<sup>®</sup> (différence d'une dilution au 1/10). Les souches présentant l'épitope mAb3/1 ont une limite de détection légèrement plus élevée que les souches ne présentant pas cet épitope (différence entre 1/10 et 1/100).

**Conclusion :** La comparaison des tests d'antigènes urinaires est facilitée par l'utilisation de LPS extrait, et serait utile dans l'avenir pour évaluer des tests en développement. Pour les Lp1, les trois tests évalués montrent des performances similaires en terme de limite de détection. Ces différences sont plus marquées pour les sérogroupes non 1 avec des limites de détection plus élevées.

## Effect of human antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila*.

P14

**Marine VANDEWALLE<sup>1-5</sup>, Pierre-Alexandre JUAN<sup>7</sup>, Emilie TALAGRAND-REBOUL<sup>8-9</sup>, Gérard LINA<sup>2-6;10</sup>, Patricia DOUBLET<sup>1-5</sup>, Sophie JARRAUD<sup>1-6</sup> and Christophe GINEVRA<sup>1-6</sup>**

<sup>1</sup> CIRI, International Center for Infectiology Research, *Legionella* pathogenesis Team, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup> Inserm, U1111, Lyon, France

<sup>3</sup> Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup> Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France

<sup>5</sup> CNRS, UMR5308, Lyon, France

<sup>6</sup> Centre National de Référence des légionelles, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>7</sup> Team « Signaling and genetics of competence development in bacterial pathogens », CNRS UMR5240 « Microbiology, Adaptation and Pathogenesis », Université Lyon 1, France

<sup>8</sup> Team « Pathogènes Hydriques Santé Environnements », UMR 5569 HSM, Université de Montpellier, France

<sup>9</sup> Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU de Montpellier, France

<sup>10</sup> CIRI, International Center for Infectiology Research, Staphylococci pathogenesis Team, Université de Lyon, Lyon, France

**Background:** Antimicrobial peptides (AMPs) are natural antibiotics widespread throughout the animal kingdom, from bacteria to mammals. They are important components of both innate and adaptive immunity, providing protection against a broad-spectrum of pathogens, such as viruses, bacteria, fungi and parasites.

**Objective:** Investigate the effect of two human AMPs (HBD-3 and LL-37) on *Legionella pneumophila*.

**Methods:** In this study, we investigated the action of synthetic LL-37 and HBD-3 on both extracellular and intracellular lifestyle of *L. pneumophila*.

**Results:** We showed that both peptides exhibit a phase dependent bactericidal effect on extracellular *L. pneumophila*. We also observed that LL-37 and HBD3 inhibit intracellular replication of *L. pneumophila* in macrophages and pneumocytes. We showed by colony counting assays that the adherence and internalization of *L. pneumophila* in both cell types was not affected in presence of LL-37, but was stimulated

in pneumocytes with HBD-3, suggesting that this two peptides restrain the bacterial replication by different mechanism of action.

**Conclusion:** Human AMPs LL-37 and HBD-3 seems to be involved in innate immunity against *L. pneumophila* by acting on the extracellular bacteria and on its intracellular replication.

## Spécificité des valeurs humaines d'expositions en évaluation du risque microbiologique : exemple des légionelles.

P15

**A. PEYRONNET<sup>1</sup>, F. WALLET<sup>1</sup>, J. CHARTON-BISSETTA<sup>2</sup>, P.-A. CABANES<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Service des Etudes Médicales, EDF, Immeuble Carré Vert, 45 rue Kléber, 92309 Levallois Perret Cedex

<sup>2</sup> EDF Recherche et Développement, 6 quai Watier, 78401 Chatou

Les nombreux usages de l'eau peuvent exposer les populations à divers pathogènes dont les légionelles, source de maladie du légionnaire ou de fièvre de Pontiac.

Des méthodes d'évaluation du risque microbiologique (ERM) ont été développées ces dernières années sur plusieurs pathogènes et notamment sur légionelles. Ces développements méthodologiques montrent qu'il manque des données pour l'étape d'évaluation des expositions, notamment en ce qui concerne les variables humaines d'exposition (VHE). En effet, les VHE ont été principalement développées pour évaluer les risques chimiques et non microbiologiques qui concernent principalement les expositions aiguës.

Les VHE visent à décrire les variables anthropométriques et physiologiques (capacité respiratoire,...) ainsi que les comportements et les habitudes locales d'une population étudiée (activités de loisirs aquatiques, consommation de produits de la mer...). Elles concernent par exemple : la masse corporelle, la surface corporelle, la fréquence respiratoire, la consommation d'aliments et d'eau, mais aussi la fréquence et la durée de l'exposition. Il peut s'agir aussi de valeurs permettant de construire des Budgets-Espace-Temps (BET) décrivant les habitudes et pratiques des populations (quel temps passé à quel endroit pour pratiquer quelle activité).

Dans cette étude nous avons identifié et collecté les données disponibles sur les VHE utilisables spécifiquement dans une évaluation des risques

légionelles pour plusieurs scénarios d'exposition. Une analyse de la qualité, de la variabilité et de la pertinence de ces données a également été réalisée. Nous avons comparé les données obtenues à celles utilisées dans des évaluations de risques récentes.

Ce travail montre qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de base de données française récente, facilement exploitable par les évaluateurs de risques. Un important travail de recherche, de compilation et d'analyse des données a donc été nécessaire. Ce travail contribue à améliorer nos connaissances et peut permettre notamment d'être plus précis dans l'évaluation des expositions et permettrait de hiérarchiser des scénarios d'exposition. De plus, il permet d'orienter les travaux d'acquisition des données manquantes.

## Analyse des génomes de 32 souches de *Legionella pneumophila* de sévérités variables afin d'identifier des déterminants de la pathogénicité.

P16

**Amandine CAMPAN-FOURNIER<sup>1,2</sup>, Christine OGER<sup>2</sup>, Christophe GINEVRA<sup>3,4</sup>, Vincent NAVRATIL<sup>2</sup>, Anne-Gaëlle RANC<sup>3,4</sup>, Guy PERRIERE<sup>1,2</sup> et Sophie JARRAUD<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université Lyon 1, UMR5558 CNRS, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622, Villeurbanne Cedex, France

<sup>2</sup> Pôle Rhône-Alpes de Bio-Informatique, Université Lyon 1, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622, Villeurbanne Cedex, France

<sup>3</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Légionelles, 59 bd Pinel, 69500, Bron, France

<sup>4</sup> Centre International de Recherche en Infectiologie, Université Lyon 1, UMR5308 CNRS, U1111 Inserm, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364, Lyon Cedex 07, France

Auteur à contacter : amandine.fournier@univ-lyon1.fr

La Légionellose est caractérisée par une pneumonie aiguë de sévérité variable. Néanmoins, parmi les patients, 98% sont hospitalisés et 40% nécessitent une admission en unité de soins intensifs (USI). Le taux de mortalité reste élevé (10% à 30% pour les patients en USI et pour les cas nosocomiaux). Des données épidémiologiques suggèrent que les souches *Legionella pneumophila* séro groupe 1 responsables de plus de 85% des cas de légionellose n'ont pas toutes le même pouvoir pathogène. La caractérisation de marqueurs bactériens pouvant être associés à la sévérité des légionelloses est un objectif de premier plan. Afin d'identifier ces déterminants, nous nous intéressons au génome et au transcriptome de 32 souches de *L. pneumophila* impliquées dans des pathologies de sévérités variables. Nous avons obtenu la séquence du génome de 16 isolats cliniques provenant de patients décédés et de 16 isolats cliniques de patients ayant survécu à l'infection, avec la technologie Illumina (MiSeq). La méthode de typage utilisée habituellement pour distinguer les différentes souches de l'espèce *L. pneumophila* consiste à séquencer 7 gènes par la technique de Sanger. Nous proposons ici de typer les souches à partir des lectures produites par le séquençage des génomes complets et de vérifier sa cohérence avec

le typage réalisé par séquençage Sanger. Ensuite, nous présentons les résultats de la comparaison de plusieurs outils d'assemblage de novo appliqués à nos données. Les génomes assemblés seront ensuite annotés et analysés pour mettre en évidence les différences génétiques distinguant les isolats, selon la sévérité de la légionellose. Nous planifions également de séquencer le transcriptome de ces mêmes souches, afin d'étudier l'expression différentielle de leurs gènes et de pouvoir ainsi caractériser plus finement les déterminants de la pathogénicité de *Legionella pneumophila*.

Projet financé par la Fondation pour la Recherche (FRM).

## Emergence d'un clone de *Legionella pneumophila* subsp. non-*pneumophila* ST701 ?

P17

**Amandine CAMPAN-FOURNIER<sup>1,2</sup>, Christophe GINEVRA<sup>3,4</sup>, Christine OGER<sup>2</sup>, Frédéric JAUFFRIT<sup>1,5</sup>, Anne-Gaëlle RANC<sup>3,4</sup>, Guy PERRIERE<sup>1,2</sup> et Sophie JARRAUD<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622, Villeurbanne Cedex, France

<sup>2</sup> Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique, Université Lyon 1, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622, Villeurbanne Cedex, France

<sup>3</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Légionelles, 59 bd Pinel, 69500, Bron, France

<sup>4</sup> Centre International de Recherche en Infectiologie, Université Lyon 1, UMR CNRS 5308, U1111 Inserm, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364, Lyon Cedex 07, France

<sup>5</sup> bioMérieux, Département de Recherche Technologique, 376 chemin de l'orme, 69280 Marcy l'Etoile, France

Parmi la soixantaine d'espèces de *Legionella*, l'espèce *Legionella pneumophila* est responsable de plus de 90% des cas de légionellose. Elle est subdivisée en trois sous-espèces : *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, *L. pneumophila* subsp. *fraseri* et *L. pneumophila* subsp. *pascullei*. Les infections impliquent principalement la sous-espèce *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*.

Dans le cadre d'une analyse de génomique comparative préliminaire portant sur 11 génomes de référence et 32 génomes nouvellement séquencés, nous avons remarqué qu'une des souches séquencées, la souche HL 0641 3006 (ST701), semble être évolutivement plus proche des sous-espèces *fraseri* et *pascullei* que de la sous-espèce *pneumophila*. Les cas de légionellose dus à des souches appartenant à ce même ST701 semblent en émergence en France : un seul cas avait été recensé entre 2006 et 2008, puis 15 cas entre 2009 et 2011 et 25 cas entre 2012 et 2014.

Nous avons entrepris une analyse phylogénétique afin de mieux caractériser les souches ST701. Les séquences des protéines ribosomiques en unicopie de plus de 60 génomes de *Legionella*, *Tatlockia*, *Fluoribacter* et *Coxiella* ont été extraites de la banque

RiboDB et alignées. Les alignements multiples ont été filtrés afin d'éliminer les régions mal alignées puis concaténés. Une procédure de sélection de modèles a été utilisée pour déterminer le modèle le plus adapté aux données. Le test AIC (*Akaike Information Criterion*) utilisé au cours de cette procédure nous a permis de déterminer que le modèle plus approprié était le LG (Le et Gascuel) avec correction par la loi Gamma, prise en compte des invariants et utilisation des fréquences observées des acides aminés (LG +  $\Gamma_4 + I + F$ ). L'arbre phylogénétique reconstruit avec ce modèle d'évolution et une méthode de maximum de vraisemblance montre que les souches de *L. pneumophila* subsp. *fraseri* et *L. pneumophila* subsp. *pascullei* forment un clade fortement soutenu et que la souche HL 0641 3006 (ST701) se place au sein de ce clade.

Ces observations suggèrent que la souche clinique HL 0641 3006 (ST701) pourrait être un clone émergent de *L. pneumophila* subsp. non-*pneumophila*. Des analyses phylogénétiques plus poussées seront réalisées par la suite pour affiner ce résultat.

# Liste des participants

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
1	ADER Florence	MCU-PH	SMIT-Hôpital de la Croix Rousse 69017 LYON Cedex 04	florence.ader@chu-lyon.fr	04 72 07 15 60
2	ADNANE Martine	Technicienne Supérieure en chef de laboratoire	Laboratoire Hygiène Ville de Paris 11 rue G Eastman 75013 PARIS	martine.adnane@paris.fr	01 44 97 88 07
3	ALLAIRE Philippe	Commercial	OXOID SAS 6 route de Paisy 69571 DARDILLY	philippe.allaire@thermofischer.com	04 72 52 33 70
4	ALLEGRA Séverine	Enseignant-Chercheur	IUT-GBGE 28 Avenue Léon Jouhaux 42100 SAINT-ETIENNE	severine.allegra@univ-st-etienne.fr	06 75 70 88 15
5	AMON Lydie Nina	Ingénieur	INSTITUT PASTEUR Département Environnement et Santé 01 BP 490 ABIDJAN 01 COTE D'IVOIRE	lydieamon@yahoo.fr	225 04 59 72 92
6	ANDREA Claire	Adjoint Technique	Pathogénèse des légionelles, CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	claire.andrea@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 67
7	ASSAIDI Abdelwahid	Etudiant Doctorant	Faculté des Sciences et Techniques, Mghila, B.P523, BENI-MELLAL, MAROC	assaidi1@gmail.com	212673392028
8	ATTAIECH Laetitia	Post-Doc	UMR5240 69100 VILLEURBANNE	laetitia.attaiech@univ-lyon1.fr	04 58 22 04 72
9	AUCHER Willy	Ingénieur Recherche	Bat B36-B37 EBI156 1 rue Georges Bonnet TSA5106 86073 POITIERS Cedex9	willy.aucher@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 06
10	BADIOU Cédric	Ingénieur	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	cedric.badiou@univ-lyon1.fr	04 78 77 86 57
11	BAILLO Nathalie	Assistant Ingénieur	Pathogénèse des légionelles, CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	nathalie.baillo@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 66
12	BASSI Clément	Epidémiologiste CIRE	CIRE Ile de France- ARS Ile de France 35 rue de la gare 75019 PARIS	clement.bassi@ars.sante.fr	01 44 02 08 21
13	BAUDE Jessica	Ingénieur	CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	jessica.baude@inserm.fr	04 78 77 86 57
14	BAUME Maud	Ingénieure Qualité	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	maud.baume@chu-lyon.fr	04 72 15 52 58
15	BEN HADJ ALI Hafida	secrétaire	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	hafida.benhadj-ali@chu-lyon.fr	04 72 12 96 25
16	BENITO Yvonne	Ingénieur	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	yvonne.benito@chu-lyon.fr	04 72 68 13 24
17	BERAUD Laetitia	Biologiste	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	laetitia.beraud@chu-lyon.fr	04 72 12 96 63
18	BERGUE Elisabeth	Infirmière Hygiène et Epidémiologie Cadre de Santé	Unité Hygiène Epidémiologie Groupement Hospitalier Est 69500 BRON	elisabeth.bergue@chu-lyon.fr	04 72 68 12 70
19	BERJEAUD Jean-Marc	Professeur	EBI-UMR7267, 1 rue Georges Bonnet TSA51106 86073 POITIERS Cedex9	jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 06
20	BERNARDIN Claire	Doctorante	UMR5557 BPOE 8 Avenue Rockefeller 69008 LYON	claire_bernardin@hotmail.com	04 78 77 71 76
21	BES Michèle	Biologiste	CNR staphylocoques, 59 bld Pinel 69500 BRON	michele.bes@chu-lyon.fr	04 72 12 96 62
22	BINET Marie	Ingénieur Chercheur	EDF RetID 78400 CHATOU	marie.binet@edf.fr	01 30 87 86 92
23	BOISSET Sandrine	MCU-PH	Laboratoire de Bactériologie CHU Grenoble CS10217 38043 GRENOBLE cedex9	sboisset@chu-grenoble.fr	04 76 76 94 92
24	BON Brigitte	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	brigitte.bon@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
25	BOUTELEUX Céline	Ingénieur Chercheur	EDF RetID 78400 CHATOU	celine.bouteleux@edf.fr	01 30 87 70 30
26	BOUTON Martine	Secrétaire	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	martine.bouton@chu-lyon.fr	04 72 12 96 21
27	BREGERON Isabelle	Secrétaire	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	isabelle.bregeron@chu-lyon.fr	04 72 12 96 22
28	BRUNEL Romain	Doctorant	UMR5240 Bat Lwoff, 10 rue Raphael Dubois	romain.brunel@etu.univ-lyon1.fr	04 72 44 58 22
29	BUCHRIESER Carmen	Directeur Recherche	Institut pasteur de Paris 25-28 rue du Docteur Roux 75015 PARIS	cbuch@pasteur.fr	01 45 68 83 72
30	BUGEJA Mark	Responsable laboratoire	SOLUBIO 1 rue de l'Ardèche 44200 SAINT HERBLAIN	m.bugeja@solubio.com	02 40 46 35 34
31	CADOUX Jean Stéphane	Responsible Qualité	CARREFOUR 91300 MASSY	jean_stephane_cadoux@carrefour.com	04 37 69 60 14
32	CAMPAN-FOURNIER Amandine	Ingénieur Bio-informaticienne	LBBE/PRABL 43 Bld du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE	amandine.fournier@univ-lyon1.fr	04 26 23 44 72
33	CAMPESE Christine	Epidémiologiste	InVS, 12 rue du Val d'Osne 94410 ST MAURICE	c.campease@invs.sante.fr	01 41 79 67 72

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
34	CARIOU Astrid	Chef projet	BIORAD 3 bld R. Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE	astrid.cariou@bio-rad.com	01 47 95 62 31
35	CARLIER Damien	Ingénieur hygiéniste	Laboratoire Hygiène Ville de Paris 11 rue G Eastman 75013 PARIS	damien.carlier@paris.fr	01 44 97 87 87
36	CASSIER Pierre	Praticien Hospitalier	Laboratoire Hygiène Hospitalière GH E Herriot 69003 LYON	pierre.cassier@chu-lyon.fr	04 72 11 07 21
37	CHAPALAIN Annelise	MCU	Pathogénèse des légionelles, CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	annelise.chapalain@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 66
38	CHARPENTIER Xavier	Chercheur CR1 Inserm	CNRS UMR5240 10 rue raphael Dubois 69100 VILLEURBANNE	xavier.charpentier@inserm.fr	04 72 44 58 22
39	CHARRIER Jean Philippe	Chercheur	Biomérieux 69280 MARCY L'ETOILE	jean.philippe.charrier@biomerieux.com	04 78 87 50 28
40	CHASTANG Joëlle	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	joelle.chastang@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
41	CHAVEROT Lucie	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	lucie.chaverot@chu-lyon.fr	04 78 77 71 76
42	COMMUN Carine	Technicienne	UMR5557 BPOE 8 Avenue Rockefeller 69008 LYON	carine.commun@univ-lyon1.fr	04 78 77 71 76
43	COMTE Audrey	Technicienne sanitaire	ARS Ain 01012 BOURG EN BRESSE	audrey.comte@ars.sante.fr	04 81 92 12 83
44	CONSEIL Pierre	IES	ARS Nord Pas de Calais 556 avenue Willy Brandt 59577 EURALLILLE	pierre.conseil@ars.sante.fr	03 62 72 78 77
45	COULIBALY Kalpy Julien	Médecin Microbiologiste Attache Recherche	INSTITUT PASTEUR Département Environnement et Santé 01 BP 490 ABIDJAN 01 COTE D'IVOIRE	jc_kalpy@yahoo.fr	225 07 91 51 76
46	CRESPI Sebastian	Head Clinical Laboratory and Biolinea Int	Camino de la Vileat 30 07014 PALMA DE MALLORCA Espagne	screspi@telefonica.net	00 34607385390
47	DAUWALDER Olivier	PH	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	olivier.dauwalder@chu-lyon.fr	04 72 12 96 69
48	DAVID Benoit	Chef de Produits Agroali- mentaire	BIOMERIEUX 69280 MARCY L'ETOILE	benoit.david@biomerieux.com	06 78 03 30 98
49	DAVID Sophia	PH Student	Wellcome trust Sanger Institute CB10 1SA CAMBRIDGE UK	sd12@sanger.ac.uk	+44 01223 494761
50	DE MONTCLOS Michèle	PH	Bactériologie CH Lyon Sud 69495 PIERRE BENITE	michele.perouse-de-montclos@ chu-lyon.fr	04 78 86 12 35
51	DEL CAMP Sophie	Commerciale Microbiologie	BIOMERIEUX 69280 MARCY L'ETOILE	sophie.delcamp@biomerieux.com	06 82 87 79 55
52	DESCOURS Ghislaine	MCU-PH	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON, INSERM U1111	ghislaine.descours@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 64
53	DOLEANS JORDHEIM Anne	MCU-PA	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	anne.doleans-jordheim@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 68
54	DOUBLET Patricia	Principal Investigator	Pathogénèse des légionelles, CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	patricia.doublet@univ-lyon1.fr	04 72 44 81 05
55	DROGUET Jérôme	Ingénieur	Hospices Civils de Lyon 49 rue Villon 69008 LYON	jerome.droguet@chu-lyon.fr	04 72 11 70 66
56	DROITCOURT Karine	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	karine.droitcourt@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
57	DROUDE Moïna	Chargée Prévention des risques liés aux légionelles	DGS 14 avenue de Ségur 75007 PARIS	moina.droude@sante.gouv.fr	01.40.56.54.18
58	DUKAN Sam	Président	Click4Tag Grand Luminy Technopole 13009 MARSEILLE	sam.dukan@click4tag.com	06 61 93 49 29
59	DUMITRESCU Oana	Biologiste	Bactériologie CHLS 69495 PIERRE BENITE	oana.dumitrescu@chu-lyon.fr	04 78 86 30 54
60	DUMONT Audrey	Etudiante	Click4Tag Grand Luminy Technopole 13009 MARSEILLE	audrey.dumont@click4tag.com	06 61 93 49 29
61	ERBILICI Tarik	Externe Pharmacie	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON, INSERM U1111	tarik.erbilici@free.fr	06 26 08 79 40
62	ESTEVE MOUSSON Isabelle	Ingénieur Etudes Sanitaires	ARS 26-28 Parc Club du Millénaire 34067 MONTPELLIER	isabelle.esteve-mousson@ars.sante.fr	04 67 07 21 79
63	ETIENNE Jérôme	PU-PH	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON, INSERM U1111	jerome.etienne@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 72
64	FEREC Christelle	Cadre de Santé	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	christelle.ferec@chu-lyon.fr	04 72 35 76 40
65	FORESTIER Virginie	Déleguée Technico Com- merciale	BIORAD 3 bldR. Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE	virginie.forestier@bio-rad.com	01 47 95 62 31
66	FOREY Françoise	Biologiste	3 impasse des Bleuets 69150 DECINES	fforey2000@yahoo.fr	06 73 60 02 13

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
67	FRANKE Florian	Epidémiologiste CIRE SUD	ARS PACA 132 bld de Paris -CS50039 13331 MARSEILLE Cedex 03	florian.franke@ars.sante.fr	04 13 55 83 19
68	FUHRMANN Christine	Médecin Biologiste	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	christine.fuhrmann@chu-lyon.fr	04 27 85 51 48
69	GAIA Valeria	Responsable CNR légionelles	Via Mirasole 22A 6500 BELLINZONA, Suisse	valeria.gai@eoc.ch	+41 91 811 17 18
70	GEISSMANN Tom	Chercheur Inserm CR1	U1111, Faculté de Médecine Laennec 69372 LYON	tom.geissmann@inserm.fr	04 78 77 86 57
71	GILBERT Christophe	MCU	Pathogénèse des légionelles, CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	christophe.gilbert.bio@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 66
72	GINEVRA Christophe	Ingénieur	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	christophe.ginevra@univ-lyon1.fr	07 78 77 86 42
73	GIRARDO Pascale	Biologiste	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	pascale.girardo@chu-lyon.fr	04 72 12 96 70
74	GOMEZ-VALERO Laura	Chargée de Recherche	Institut Pasteur de Paris 25-28 rue du Docteur Roux 75015 PARIS	lgomez@pasteur.fr	06 68 56 10 33
75	GOUNON Magali	TDE CRVGS-CRDS	ARS Ardèche 07007 PRIVAS	magali.gounon@ars.sante.fr	04 26 20 92 77
76	GRANDO Jacqueline	PH	Unité Hygiène Epidémiologie Groupement Hospitalier Est 69500 BRON	jacqueline.grando@chu-lyon.fr	04 72 68 12 70
77	GSTALDER Marie-Eve	Expert métier/Risques sani- taires Eau/Air	COFELY GDF-SUEZ 15,allé du Vieux Chêne 38240 MEYLAN	marie-eve.gstalder@cofely-gdfsuez.com	04 76 25 94 62
78	GUILLAUME Carole	Ingénieur Chercheur	EDF ReID 78400 CHATOU	carole.guillaume@edf.fr	01 30 87 79 59
79	HALLIER-SOULIER Sylvie	Responsabel R D	PALL 4 rue du Courtil 35170	sylvie_hallier@europe.pall.com	
80	HENNEBIQUE Aurélie	Interne Biologie Médicale	CHU Grenoble CS10217 38043 GRENOBLE cedex9	ahennebique@chu-grenoble.fr	06 70 15 65 77
81	HOSPITALIER Juliette	Chef de projet ANSES	ANSES 14 rue Pierr et Marie Curie 94701 MAISONS-ALFORT Cedex	juliette.hospitalier@anses.fr	01 49 77 38 31
82	HUBE Stéphane	Technicien sanitaire	ARS 97743 SAINT-DENIS cedex 9 Ile de la REUNION	stephane.hube@ars.sante.fr	02 62 97 93 61
83	JACOTIN Nathalie	Ingénieur Biologie	LYON	nathalie.jacotin@gmail.com	06 63 44 19 85
84	JARRAUD Sophie	MCU-PH directrice CNR légionelles	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON, INSERM U1111	sophie.jarraud@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 65
85	JUAN Pierre-Alexandre	Doctorant	UMR5240 Bat Lwoff, 10 rue Raphael Dubois, 69622 VILLEURBANNE	pierre-alexandre.juan@etu.univ-lyon1.fr	04 72 44 58 22
86	KANAAN Hussein	PHD student	Pathogénèse des légionelles, CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	hussein.a.kanan@gmail.com	06 63 84 38 85
87	KAY Elisabeth	CR CNRS	Pathogénèse des légionelles, CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	elisabeth.kay@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 67
88	KHODR Ahmad	Chercheur post doc	Institut Pasteur de Paris 25-28 rue du Docteur Roux 75015 PARIS	ahmad.khodr@pasteur.fr	01 45 68 95 40
89	KISSIEDOU Koman Eugène Patrice	Technicien Supérieur Santé	INSTITUT PASTEUR Département Environnement et Santé 01 BP 490 ABIDJAN 01 COTE D'IVOIRE	kissekoman@yahoo.fr	225 07 58 35 90
90	LAHUTTE Flavien	Assistant Commercial France	INTERSCIENCE 30 chemin du Bois des Arpents 78860 SAINT NOM LA BRETECHE	flahutte@interscience.com	01 34 62 62 61
91	LAKEHAL Yamina	Secrétaire	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	yamina.lakehal@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
92	LAWRENCE Christine	Praticien Hospitalier Hygiène	Hôpital R. Poincaré 92380 GARCHES	christine.lawrence@aphp.fr	01 47 10 77 25
93	LE CANN Pierre	Enseignant-Chercheur	EHESPA Av Pr L2on Bernard CS74312 35043 RENNES	pierre.lecann@ehesp.fr	02 99 02 26 81
94	LE PERFF Herve	Epidémiologiste	CIRE Rhône Alpes 241 rue Garibaldi 69003 LYON	herve.leperff@ars.sante.fr	04 72 34 41 41
95	LELEKOV-BOISSARD Taïssia	Attachée Recherches Cliniques	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	taïssia.lelekov-boissard@chu-lyon.fr	04 72 12 96 50
96	LELOGEAIS Virginie	Doctorante	CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	virginie.lelogeais@gmail.com	04 72 43 13 67
97	LEPOUTRE Agnès	Médecin Epidémiologiste	InVS, 12 rue du Val d'Osne 94410 St MAURICE	a.lepoutre@invs.sante.fr	01 41 79 68 91
98	LINA Gérard	PU-PH co-directeur CNR légionelles	Bactériologie CHLS 69495 PIERRE BENITE	gerard.lina@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 67

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
99	LOISEAU Clémence	Doctorante	EBJ UMR CNRS 7267;equipe Microbiologie de l'Eau 86073 POITIERS Cedex9	clemence.loiseau@univ-poitiers.fr	05 49 45 37 65
100	MAGNE Sébastien	Ingénieur Sanitaire	ARS Auvergne DT-Cantal 15005 AURILLAC	sebastien.magne@ars.sante.fr	04 63 27 30 03
101	MARQUANT Arielle	Médecin Santé Publique	ARS Franche Comté 3 Av Louise Michel 25000 BESANCON	arielle.marquant@ars.sante.fr	03 81 47 88 06
102	MARQUET Marie Françoise	Chef de Produits	OXOID SAS 6 route de Paisy 69571 DARDILLY	marie-francois.marquet@thermofischer.com	04 72 52 33 70
103	MASSIP Clémence	Interne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	clemence-massip@wanadoo.fr	
104	MAURIN Max	PU-PH	CHU Grenoble CS10217 38043 GRENOBLE cedex9	mmaurin@chu-grenoble.fr	04 7676 54 79
105	MEBARKI Farida	Directeur Laboratoire	BIOFIDAL-DTAMB 170 Avenue gabriel Péri 69120 VALUX EN VELIN	fmebarki@biofidal.com	04 37 45 02 96
106	MEHLSSEN Simon	Chief Commercial Officer	TANDRUP Gydevand1 ALLEROD Danmark	skm@tandrup.dk	00 45 61610315
107	MENGUE Luce	Etudiante	Université de Poitiers EBI UMR7267, 1 rue Georges Bonnet TSA5106 86073 POITIERS Cedex9	luce.mengue.assoumou.louma@univ-poitiers.fr	06 59 65 33 58
108	MENUJER Luce	Epidémiologiste	ARS Centre 45044 ORLEANS	luce.menujier@ars.sante.fr	02 38 77 47 47
109	MEUGNIER Hélène	Ingénieur	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	helene.meugnier@chu-lyon.fr	07 72 12 95 80
110	MICHARD Céline	ATER	BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	celine.michard@etu.univ-lyon1.fr	04 72 43 13 66
110	MICHEL Laurent	Commercial	PALL 4 rue du Courtil 35170	laurent_michel@europe.pall.com	06 07 76 60 46
112	MOAL Stéphane	Ingénieur Commercial	GATC, 4, rue des Bonnes Gens, 68100 MULHOUSE	s.moal@gatc-biotech.com	06 88 92 37 23
113	MOREAU Karen	PU	CIRI INSERM 1111, 7 rue Guillaume paradin 69372 LYON	karen.moreau@univ-lyon1.fr	04 78 77 86 57
114	MORET Dominique	Technicien	12 montée des fruitiers 69520 GRIGNY	dominique.moret12@orange.fr	06 14 35 12 33
115	MOUTEAUX Laurent	Ingénieur Conseil	OREAU BP51 55300 SAINT-MIHIEL	laurent.mouteaux@oreau.fr	06 33 07 56 66
116	NAIGLIN laurence	Chef de Projet	ECOFECT Université de LYON, 43 bld du 11 Novembre 1918, Bat Atrium 69622 VILLEURBANNE	laurence.naiglin@univ-lyon1.fr	04 72 43 18 05
117	NOUVELLON Michèle	Praticien Hospitalier	Laboratoire d'Hygiène CHU ROUEN	michele.nouvelon@chu-rouen.fr	02 32 88 86 32
118	OUATTARA Stapedien Aminata	Technicienne	INSTITUT PASTEUR Département Environnement et Santé 01 BP 490 ABIDJAN 01 COTE D'IVOIRE	amiouat1@yahoo.fr	225 78 22 78 93
119	PAGES-MONTEIRO Laurence	ATER	UMR5557 BPOE 8 Avenue Rockefeller 69008 LYON	laurencepages@hotmail.com	04 78 77 71 76
120	PASTORI Frédéric	Chef de produit	BIORAD 3 bldR. Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE	frederic.pastori@bio-rad.com	01 47 95 60 00
121	PATOT Sabine	Post Doc	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	sabine.bourdeau-patot@univ-lyon1.fr	04 78 77 87-26
122	PAYOT Sébastien	Cadre de Santé	CNR légionelles, HCL LYON	sebastien.payot@chu-lyon.fr	04 72 35 76 40
123	PIERRE Sophie	Responsible R et D	BIORAD 3 bldR. Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE	sophie.pierre@bio-rad.com	01 47 95 62 31
124	PLANEL Amélie	Ingénieur ARS	ARS Rhône Alpes 241 rue Garibaldi 69003 LYON	amelie.planel@ars.sante.fr	04 72 34 74 14
125	PLOTON Christine	Praticien Attaché	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	christine.ploton@chu-lyon.fr	04 72 12 96 21
126	PORTIER Emilie	ATER	1 rue Georges Bonnet TSA5106 86073 POITIERS Cedex9	emilie.portier@univ-poitiers.fr	05 49 45 36 19
127	POSPISIL Florence	Médecin	Service de lutte contre les infections nosocomiales, CH Avignon, 84902 AVIGNON cedex9	Fpospisil@ch-avignon.fr	04 32 75 34 51
128	POTHIER Joel	Chercheur	Zurich University of Applied Sciences 8820 WADENSWIL SUISSE	joel.pothier@zhaw.ch	00 41 58 934 53 21
129	RAGOZIN Nathalie	Médecin	ARS Délégation Drome 26000 VALENCE	nathalie.ragozin@ars.sante.fr	04 75 79 71 54
130	RANC Anne Gaelle	AHU	Laboratoire de Bactériologie CH LYON SUD	anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr	04 72 12 96 01
131	RATHAVONG Thomas	Ingénieur Technico Commercial	ALERE 21 rue Albert Calmette 78350 JOUY en JOSAS	thomas.rathavong@alere.com	06 76 72 01 54
132	REBOULET Jérémy	Technicien	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	jeremy.reboulet@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
133	RETEL Olivier	Epidémiologiste	InVS - ARS Franche Comté 3 av Louise Michel 25000 BESANCON	olivier.retel@ars.sante.fr	

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
134	REYROLLE Monique	Ingénieur	32 chemin de la teyssonnrière 69140 RILLIEUX	monique.nowicki.reyrolle@gmail.com	06 70 84 33 34
135	RIFFARD Serge	PU	GIMAP Faculté de Médecine 42003 SAINT ETIENNE	serge.riffard@univ-st-etienne.fr	06 07 75 16 62
136	ROBERT Stéphane	Auditeur Qualité	Groupe LACTALIS 53000 LAVAL	stephane.robert@lactalis.fr	06 10 12 72 88
137	ROURE SOBAS Chantal	Biologiste	Laboratoire de Bactériologie Hôpital de la Croix Rousse 69004 LYON	chantal.sobas@chu-lyon.fr	04 72 07 18 41
138	ROUSSELIN Philippe	EMEA Regulatory manager	IDEXX 84 rue Charles Michels 93200 SAINT-DENIS	philippe-rousseau@idexx.com	01 69 28 04 94
139	RUTSCHI Helena	FF cadre de santé	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	helena.rutschi@chu-lyon.fr	04 72 35 76 40
140	SALORD Hélène	Biologiste	Laboratoire de Bactériologie Hôpital de la Croix Rousse 69004 LYON	helene.salord@chu-lyon.fr	04 72 07 18 41
141	SAMBA-LOUAKA Ascel	Maître de Conférences	PBS, 1 rue Georges Bonnet 86073 POITIERS Cedex9	ascel.samba@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 13
142	SCHROEDER Gunnar	Research Associate	Center for Molecular Bacteriology and Infection; Flowers Building 1st floor SW7 2AZ LONDON, UK	g.schroeder@imperial.ac.uk	44 20 7594 3068
143	SIFFERT Marielle	Technicienne	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	marielle.siffert@chu-lyon.fr	04 72 12 96 24
144	SILOUÉ Yassoungo	Médecin-Epidémiologiste	Millénaire 2, 35 rue de la Gare 75935 PARIS	yassoungo.silue@ars.sante.fr	01 44 02 08 24
145	SIMOES Patricia	Ingénieur	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	patricia.martine-simoes01@chu-lyon.fr	04 72 00 37 93
146	SOUAMI Kahina	Médecin Biologiste	Faculté de Médecine ALGER, ALGERIE	kahinasouami@gmail.com	00 23 556 60 35 41
147	SPIRIT Nicholas	Etudiant	Faculté de Médecine 7 rue Guillaume Paradin 69008 LYON	nicholas.spirit@gmail.com	0044 75 1 629 56 66
148	SQUINAZI Fabien	Médecin Biologiste	10 Bld Jourdan 75014 PARIS	squinazi@club-internet.fr	06 07 64 47 40
149	STAUFFERT Magalie	ATER	IUT-GBGE 28 Avenue Léon Jouhaux 42100 SAINT-ETIENNE	magalie.stauffert@univ-st-etienne.fr	06 83 27 44 79
150	TILLAUT Hélène	Ingénieur épidémiologiste	ARS Bretagne-CIRE Ouest35042 6 plade Colombes 35042 RENNES cedex	helene.tillaut@ars.sante.fr	02 22 06 74 77
151	VAISSIERE Emmanuelle	Ingénieur Epidémiologiste	ARS Auvergne 60 avenue de l'Union Soviétique 63057 CLERMONT-FERRAND	emmanuelle.vaissiere@ars.sante.fr	04 73 74 50 41
152	VANDENESCH François	PU-PH, directeur CNR staphy- locoques	Laboratoire de Bactériologie Centre de Biologie Est, 59 Bld Pinel 69500 BRON	francois.vandenesch@univ-lyon1.fr	04 72 15 72 52
153	VANDEWALLE Marine	Thésarde	Equipe Pathogénèse des légionelles, rue Guillaume Paradin 69008 LYON	marinevandewalle@hotmail.fr	06 16 36 20 97
154	VANHEMS Philippe	PU-PH	Laboratoire Hygiène Hospitalière GH E Herriot 69003 LYON	philippe.vanhems@chu-lyon.fr	04 72 11 07 20
155	VERDON Julien	Maître de Conférences	TSA 5106 1 rue Georges Bonnet 86073 POITIERS Cedex9	julien.verdon@univ-poitiers.fr	05 49 45 36 93
156	VIANNEY Anne	MCU	Pathogénèse des légionelles, CIRI INSERM U111, BatA Lwoff, 10 rue Dubois 69622 VILLEURBANNE	anne.vianney@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 67
157	VILLE Laurent	Expert National Maladies Infectieuses	ALERE 21 rue Albert Calmette 78350 JOUY en JOSAS	laurent.ville@alere.com	06 82 82 60 87
158	VINCENT Florence	Ingénieur Etudes	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	florence.couzon@univ-lyon1.fr	04 78 77 86 57
159	WALLET France	Médecin	EDF Service Etudes Médicales 45 rue Kléber 92309 LEVALLOIS-PERRET Cedex	France.wallet@edf.fr	01 82 24 84 92
160	YVON Jean-Marc	Ingénieur Epidémiologiste	CIRE Rhône Alpes 241 rue Garibaldi 69003 LYON	jean-marc.yvon@ars.sante.fr	04 72 34 41 64
161	ZEROUAL Yamina	Commercial France Sud-Est	INTERSCIENCE 30 chemin du Bois des Arpents 78860 SAINT NOM LA BRETECHE	yzeroual@interscience.com	01 34 62 62 61
162	SEBIRE Bernard	ENS régisseur	46 allé d'Italie 69007 LYON	bernard.sebire@ens-lyon.fr	
163 164 165 166	Accueil, Micros (4 stagiaires)	Ecole TUNON	19 place Tolozan 69001 LYON	lyon@ecoletunon.com	04 78 28 85 16
167	Musée des Confluences	viiste guidée et dîner	86 quai Perrache 69002 LYON	www.museedesconfluences.fr	04 28 38 12 13
168	Sécurité	AXIOM Sécurité	99 rue de Gerland 69362 LYON Cedex 07	secretariat.agence-rhone@isopro- securite.com	0 820 280 280

A series of horizontal dotted lines for writing notes on the left page.A series of horizontal dotted lines for writing notes on the right page.

A series of horizontal dotted lines for writing notes on the left page.A series of horizontal dotted lines for writing notes on the right page.

# SympoLegio

Lyon - 17 et 18 novembre 2015

## SPONSORS



## PARRAINS

