

SympoLegio

Lyon - 26 et 27 novembre 2013

Legionella de l'environnement à l'homme

26 et 27 novembre 2013

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

LYON

■ 8H30 - 9H30 : **ACCUEIL**

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

Session 1. ÉPIDÉMIOLOGIE

Modérateurs : *Didier CHE et Sophie JARRAUD*

9H35 - 9H50 : **Julien BEAUTE** (ECDC, Stockholm, Suède). La surveillance de la maladie des légionnaires en Europe.

9H50 - 10H05 : **Christine CAMPESE** (InVS, St Maurice). Caractéristiques épidémiologiques des cas de légionellose en 2012 en France.

10H05 - 10H30 : **Lisa CONZA** (Bellinzona, Suisse). Incidence de la légionellose et données météorologiques.

10H30 - 10H45 : **Philippe CANTIN** (Québec, Canada). L'éclosion de Québec et la mise en vigueur d'un règlement sur l'entretien des tours aéroréfrigérantes.

10H45 - 11H00 : **Clément BASSI** (Hauts-de-Seine). Investigation d'un épisode de cas groupés de légionellose dans les Hauts-de-Seine, août 2012.

11H00 - 11H15 : **Mariam MEKKOUR** (Casablanca, Maroc). *Legionella pneumophila* et légionellose : épidémiologie, incidence et état des lieux au Maroc.

■ 11H15 - 11H30 : **PAUSE - SESSION POSTER**

Session 2. SUSCEPTIBILITES DE L'HÔTE

Modérateurs : *Max MAURIN et Florence ADER*

11H45 - 12H10 : **Fanny LANTERNIER** (Paris). Risques de légionellose liés aux anti-TNF α .

12H10 - 12H25 : **Pierre CASSIER** (Lyon). Facteurs de risque associés aux souches de légionelles.

12H25 - 12H40 : **Sophie GARDES** (Lyon). Prévention de légionellose nosocomiale, patients « à risques » : vers le risque nul ?

■ 12H40 - 14H30 : **DÉJEUNER - SESSION POSTER**

Session 3. AGENTS ANTI-LEGIONELLA ET RESISTANCE

Modérateurs : *Max MAURIN et Florence ADER*

14H30 - 14H55 : **Lubana SHADOUD** (Grenoble). Résistance des légionelles aux quinolones.

14H55 - 15H20 : **Ghislaine DESCOURS** (Lyon). Mécanisme de résistance des légionelles aux macrolides.

15H20 - 15H35 : **Clémence LOISEAU** (Poitiers). Activité anti-*Legionella* de *Bacillus* sp.

Session 4. LEGIONELLA ET ENVIRONNEMENT

Modérateurs : Christine LAWRENCE et Valeria GAIA

15h35 – 16h00 : **Valeria GAIA** (Bellinzona, Suisse). Utilisation de la co-culture ambiante pour la détection de *Legionella* spp. dans l'environnement.

■ 16h00 - 16h30 : PAUSE - SESSION POSTER

16h30 – 16h55 : **Thibaut EPALLE** (St Etienne). Evaluation de la reviviscence de formes viables non cultivables de *L. pneumophila* après différents stress.

16h55 – 17h20 : **Sam DUKAN** (Marseille). Détection et dénombrement de *Legionella pneumophila* : nouveaux développements méthodologiques.

17h20 – 17h35 : **Gilbert GREUB** (Lausanne, Suisse). Légionelles : de l'usine de traitement d'eau au robinet.

17h35 – 17h50 : **Pierre LE CANN** (Rennes). Stabilité spatio-temporelle des souches de *L. pneumophila* dans l'environnement.

■ 20h00 - 23h15 : DINER - ABBAYE DE COLLONGES PAUL BOCUSE

■ 8h30 - 9h00 : **ACCUEIL**

9h00 - 9h20 : **Laura GOMEZ-VALERO** (Paris). Retour sur *Legionella* 2013.

Session 5. GENOMIQUE

Modérateurs : Gérard LINA et Gilbert GREUB

- 9h20 – 9h45 : **Carmen BUCHRIESER** (Paris). Population genomics and evolution of virulence of *Legionella*.
- 9h45 – 10h10 : **Claire BERTELLI** (Suisse). Genetic exchanges between *Legionella*, its amoebal host and other intracellular bacteria.
- 10h10 – 10h35 : **Xavier CHARPENTIER** (Lyon). Genetics of natural transformation in *Legionella pneumophila*.
- 10h35 – 10h50 : **Romain BRUNEL** (Lyon). Essentialité du tmRNA pour la croissance et la virulence de *Legionella pneumophila*.
- 10h50 – 11h05 : **Ahmad KHODR** (Paris). Comparative analysis of type IV secretion system (T4ASS) in 42 *Legionella pneumophila* strains of different serogroups.

■ 11h05 - 11h40 : **PAUSE - SESSION POSTER**

Session 6. LEGIONELLA ET BIOFILM

Modérateurs : Serge RIFFARD et Patricia DOUBLET

- 11h40 – 12h05 : **Yann HECHARD** (Poitiers). Biofilms et *Legionella*, des relations complexes.
- 12h05 – 12h30 : **Sophie PECASTAINGS** (Toulouse). Rôle des voies de signalisation impliquant le di-GMP cyclique dans la formation de biofilm chez *Legionella pneumophila*.
- 12h30 – 12h45 : **Renaud BIGOT** (Poitiers). La réplication chez *Acanthamoeba castellanii* active le développement et la formation de biofilm et induit un chimiotactisme chez *Legionella pneumophila*.

■ 12h45 - 14h30 : **DÉJEUNER - SESSION POSTER**

Session 7. LEGIONELLA ET BIOFILM

Modérateurs : Carmen BUCHRIESER et Yann HÉCHARD

- 14h30 – 14h55 : **Antje FLIEGER** (Wernigerode, Allemagne) . *Legionella* phospholipases implicated in virulence.
- 14h55 – 15h20 : **Christophe GILBERT** (Lyon). Un système de sécrétion de type 1 chez *Legionella pneumophila* impliqué dans la virulence.
- 15h20 – 15h35 : **Emilie PORTIER** (Poitiers). Impact de la carence en fer sur l'expression des gènes de *L. pneumophila*.
- 15h35 – 15h50 : **Julie ALLOMBERT** (Lyon). Trois enzymes antagonistes impliquées dans les voies de signalisation à diGMP cyclique favorisent la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* en contribuant à la sécrétion appropriée des effecteurs du système Dot/Icm.
- 15h50 – 16h05 : **Céline MICHARD** (Lyon). La protéine kinase LegK2 de *L. pneumophila* cible le complexe ARP2/3 de l'hôte pour inhiber la polymérisation d'actine sur la LCV et permettre l'échappement des bactéries à la voie endocytaire.

■ 16h05 - 16h15 : **CONCLUSIONS**



Comité local d'organisation



S. Jarraud



G. Lina



J. Etienne



H. Meugnier



H. Benhadj, Y. Lakehal,
L. Buchwalter et I. Bregeron



Comité scientifique



F. Ader



C. Buchrieser



D. Che



P. Doublet



G. Greub



Y. Hechard



C. Lawrence



M. Maurin



S. Riffard

Bienvenue à SympoLegio 2013 : *Legionella* de l'environnement à l'homme.

Cher(es) collègues et ami(e)s

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

Nous espérons que le SYMPOLEGIO 2013 vous apportera autant de satisfactions scientifiques et humaines que les 2 précédentes versions. La transdisciplinarité reste toujours l'objectif du programme avec des intervenants et des participants issus de la santé publique, de la microbiologie clinique et environnementale et des sciences plus fondamentales. Les travaux présentés traiteront d'épidémiologie, des susceptibilités de l'hôte, des agents anti-*Legionella* et de résistance, de *Legionella* et environnement, de biofilms, de génomique, et des interactions de *Legionella* avec ses hôtes eucaryotes.

Selon notre volonté initiale, la francophonie reste dominante mais nous accueillerons également quelques interventions en anglais. Nous remercions nos orateurs et participants plus « lointains » (Algérie, Maroc, Côte d'Ivoire, Canada, Allemagne, Suisse, Espagne et Belgique). Nous espérons que chacun d'entre vous profitera pleinement de ces deux journées pour se documenter, échanger entre collègues afin d'améliorer et enrichir ses connaissances sur cette bactérie passionnante qui est à l'origine de toutes nos études, protocoles et recherches.

Nous profitons de cet instant pour remercier et exprimer toute notre reconnaissance à nos parrains et sponsors qui ont contribué à la réalisation du SYMPOLEGIO 2013.

Bienvenue à tous et merci de votre participation.

Le Comité d'Organisation

LEGIONELLES

Centre National de Référence

The image features a teal-colored rectangular area at the bottom, partially obscured by a white curved shape that resembles a large 'C' or a partial circle. A thin blue line follows the top curve of this shape. A vertical blue line is positioned on the left side of the teal area.

Communications orales

La surveillance de la maladie des Légionnaires en Europe.



J. BEAUTÉ

Julien BEAUTÉ ¹

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

Depuis 2010, le Centre Européen de Prévention et Contrôle des Maladies (ECDC) coordonne le réseau européen de surveillance de la maladie des Légionnaires (ELDSNet). Ce réseau est constitué d'épidémiologistes et de microbiologistes issus des 27 pays de l'Union Européenne (UE), d'Islande et de Norvège et nommés par leur autorité nationale. Les objectifs de la surveillance sont (1) de suivre l'épidémiologie de la maladie des Légionnaires dans le temps tant pour les cas communautaires que les cas liés au voyage ou nosocomiaux (2) de collecter des données microbiologiques (3) de promouvoir le développement d'un réseau de laboratoires (4) de mettre en place des formations pour les professionnels.

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

En 2012, 5 852 cas ont été notifiés en Europe, soit 11.5 cas/million d'habitants. Relativement stable depuis 2005, ce taux de notification était très variable selon les pays (nul en Bulgarie, proche de 40/million en Slovénie). Six pays (Italie, France, Espagne, Allemagne, Pays-Bas et Royaume-Uni) représentaient 84% des cas. Près de 70% des cas étaient des pneumonies communautaires, 20% des cas liés

aux voyages et moins de 10% survenaient dans des établissements de santé. Le taux de létalité était de 10% avec un risque accru chez les personnes âgées. Le diagnostic était réalisé par la mise en évidence de l'antigène urinaire dans 80% des cas et seuls 10% des cas étaient confirmés par culture. La surveillance quotidienne a permis la notification de 99 clusters dont 44% n'auraient pu être détectés sans le réseau.

ELDSN et est le réseau international le plus important au monde pour la maladie des Légionnaires.

Caractéristiques épidémiologiques des cas de légionellose en 2012 en France.



C. CAMPÈSE

Christine CAMPÈSE¹, Catherine MAINE¹, Sophie JARRAUD², Françoise FOREY² et Didier CHE¹

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

² Centre national de référence des légionelles, Lyon, France

c.campese@invs.sante.fr

En 2012, 1298 cas de légionellose ont été déclarés, soit un taux de déclaration de 2,0 cas pour 100 000 habitants. Le nombre de cas a augmenté de 11% entre 2011 et 2012 (1170 versus 1298 cas) mais reste inférieur à celui de 2010 où 1540 cas avaient été notifiés.

En 2012, l'âge médian des cas était de 62 ans, le sexe ratio homme/femme de 2,9 et la létalité de 10,7% (130 décès/1217 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 0,3/10⁵ en Basse-Normandie à 5,9/10⁵ en Franche-Comté.

La majorité des cas (96%) avait été diagnostiquée par un test de détection urinaire. Une amplification génique (PCR) avait été positive pour 41 cas et pour 11 d'entre eux, la PCR était l'unique méthode de diagnostic biologique. Parmi l'ensemble des cas, une souche avait été isolée chez 307 cas (24%). Ce pourcentage était supérieur à celui de 2011 (22,5%). La majorité (96%) des souches était des souches *Legionella pneumophila* séro groupe 1. Pour 67 cas (23%), la souche humaine avait pu être comparée aux souches environnementales isolées d'un lieu fréquenté par le malade, et pour 30 cas (45% des comparaisons mais seulement 2,3% de la totalité des 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 (39%). Le mode d'exposition principal était un voyage (19%) avec un séjour dans un établissement de tourisme pour 139 cas (11%). En 2012, 190 établissements français ont été notifiés par le réseau européen ELDSN et dont 13

avaient accueilli au moins 2 cas sur une période de deux ans, et pour 5 (38%) d'entre eux, les prélèvements issus du réseau d'eau sanitaire et réalisés à l'occasion de l'investigation montraient la présence de légionelles avec un taux supérieur au seuil réglementaire.

En 2012, des investigations de cas groupés (moins de 10 cas) ont été réalisées par les ARS en collaboration avec les Cires. Parmi ces investigations, les circuits de refroidissements d'une tour aéroréfrigérante ont été identifiés comme la source la plus probable de contamination de 8 cas ; 3 cas communautaires et 5 cas demeurant en maison de retraite située en région Ile de France. Les autres investigations de cas groupés n'ont pas permis d'identifier de source commune de contamination. Lors de ces investigations, bien que les cas soient regroupés dans l'espace et le temps, les analyses génotypiques des souches cliniques disponibles présentaient quelquefois des profils différents. Dans ce contexte, il était difficile de déterminer si tous les cas étaient liés à une source commune de contamination ou s'il existait parmi eux, des cas sporadiques concomitants.

Le bilan des cas de légionellose survenus en France en 2012 montre une augmentation par rapport à l'année 2011. Les caractéristiques épidémiologiques des cas ainsi que le gradient géographique du taux d'incidence « Ouest-Est » restent néanmoins similaires à la situation observée les années précédentes. Par ailleurs, le pourcentage de souches isolées continue d'augmenter permettant ainsi de disposer d'une meilleure capacité pour identifier les sources de contamination et documenter le caractère groupé des cas.

Incidence de la légionellose et données météorologiques.



L. CONZA

L. CONZA¹, S. PAGANI CASATI², C. LIMONI³ and V. GAIA¹

¹ Servizio di microbiologia EOLAB, CNR pour Legionella, Bellinzona, Suisse.

² Ufficio del medico cantonale, Bellinzona, Suisse.

³ Alpha5, Biometrics & Data Management, Riva San Vitale, Suisse.

Les bactéries du genre *Legionella* colonise l'environnement hydrique naturel, artificiel et certaines espèces peuvent provoquer la légionellose. L'incidence moyenne de légionellose en Europe entre 2003 et 2007 était 1-1,3 cas pour 100'000 habitants par an, en Suisse, dans la même période, l'incidence était 2-2,5 cas par 100'000 habitants par an. Dans la région suisse du sud (canton du Tessin) l'incidence était trois fois plus élevé (environ 6/100'000). En Suisse, la plupart des cas sont sporadiques et classifiés comme communautaire.

Des études antérieures ont montré que le temps chaud, humide et les précipitations ont été associés à un risque accru de légionellose. Par conséquent, en Suisse, le climat pourrait jouer un rôle important dans la transmission de légionellose à partir de sources situées à l'intérieur de la communauté mais qui peut rarement être identifié.

Le but de notre étude était d'identifier les facteurs météorologiques qui pourraient être associés à un risque accru pour l'acquisition de légionellose communautaire dans deux régions suisses. Nous avons conduit une étude épidémiologique rétrospective en utilisant une analyse discriminante multivariée et des régressions de Poisson.

L'analyse discriminante a montré que les deux régions sont caractérisées par des particulières conditions météorologiques. L'analyse avec la régression de Poisson multiple identifié région, température et pression de vapeur au cours du mois d'infection

comme des facteurs de risque significatifs pour la légionellose. Il y avait un risque accru relative de légionellose de 11,4 % (IC 7,70 % à 15,30 % à 95%) pour chaque 1 hPa montée de la pression de vapeur ou de 6,7 % (IC de 4,22% à 9,22% à 95%) pour 1°C d'augmentation de la température.

En conclusion, la pression de vapeur plus élevée et la chaleur ont été associées à un risque plus élevé d'acquisition une légionellose communautaire dans les deux régions de la Suisse.

L'éclosion de Québec et la mise en vigueur d'un règlement sur l'entretien des tours aéroréfrigérantes.



P. CANTIN

Philippe CANTIN

Ph.D., microbiologiste

Direction des expertises et des études
Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs
2700, rue Einstein, bureau E.2.220
Québec (Québec) G1P 3W8
Téléphone : 418 643-1301, poste 228
Télécopieur : 418 528-1091
philippe.cantin@mddefp.gouv.qc.ca
<http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/>

La ville de Québec (Canada) a connu une importante éclosion de légionellose à l'été 2012, avec 181 cas dont 13 décès. La source de cette éclosion s'est avérée être une tour aéroréfrigérante pour la climatisation située au centre de la ville de Québec. Au moment de cette éclosion, aucun règlement n'obligeait les propriétaires de tours aéroréfrigérantes à gérer le risque causé par *Legionella*. Depuis le début de l'été 2013, le gouvernement du Québec a mis en vigueur un règlement qui oblige les propriétaires à faire l'entretien des tours de refroidissement et envisage de bonifier son règlement en 2014.

Cette présentation vise à faire un retour sur l'éclosion de 2012 et à expliquer les actions entreprises par le gouvernement du Québec pour éviter qu'un tel événement se reproduise.

Investigation d'un épisode de cas groupés de légionellose dans les Hauts-de-Seine, août 2012.



C. BASSI

M. TAOUQI ⁽¹⁾, **C. BASSI** ⁽¹⁾, **K. ANDRIANARIJAONA** ⁽²⁾, **G. JUE** ⁽²⁾, **A. BRASSEUR** ⁽³⁾, **C. MERLE** ⁽³⁾, **B. LORENZI** ⁽⁴⁾, **L. BERNARD** ⁽⁵⁾, **S. JARRAUD** ⁽⁶⁾ et **C. CAMPÈSE** ⁽⁷⁾

¹ Cellule de l'InVS en régions (Cire) Ile-de-France Champagne Ardenne

² Délégation Territoriale des Hauts-de-Seine, ARS Ile-de-France (ARS-DT92)

³ Cellule Régionale de Veille, Alerte et Gestion Sanitaires, ARS Ile-de-France (CRVAGS)

⁴ Unité Territoriale des Hauts-de-Seine, Direction régionale et interdépartementale de l'environnement et de l'énergie (DRIEE)

⁵ Service Communal d'Hygiène et de Santé (SCHS), Meudon

⁶ Centre National de Référence des Légionelles, Lyon

⁷ Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice

Introduction : En août 2012, 7 cas de légionellose étaient déclarés à l'Agence régionale de santé (ARS) d'Ile-de-France, dont 5 cas résidents d'un Etablissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (Ehpad) de Meudon et 2 cas communautaires domiciliés à proximité. Une investigation fut menée par l'ARS, en lien avec la Cire, la Direction Générale de la Santé, l'Institut de Veille Sanitaire et le Centre national de référence (CNR), avec l'appui des partenaires locaux : DRIEE et Service Communal d'Hygiène et de Santé. Les objectifs étaient de décrire l'épisode épidémique et d'identifier la ou les sources communes de contamination afin de mettre en place les mesures de contrôle et de prévention.

Méthodes : Un cas a été défini comme toute personne ayant présenté depuis le 15 juillet 2012 une pneumopathie confirmée radiologiquement avec une confirmation biologique de légionellose à *Legionella pneumophila* sérotype 1 (*Lp1*) et résidant ou travaillant dans l'Ehpad de Meudon ou ayant fréquenté l'établissement ou un périmètre de 2,5 km autour de cet établissement pendant les 10 jours précédant le début des signes.

L'investigation a comporté 4 volets : épidémiologique, environnemental, microbiologique et climatologique.

Une recherche active de cas fut entreprise. L'enquête environnementale abordait toutes les pistes de contamination, particulièrement les tours aéroréfrigérantes (TAR). Les souches cliniques et environnementales de légionelles isolées furent typées au CNR. Les paramètres climatologiques fournis par Météo-France furent intégrés dans les hypothèses de diffusion épidémique.

Résultats : Huit cas de légionellose à *Lp1* furent enregistrés, parmi lesquels 5 cas résidents de l'Ehpad (3 décédés) et 3 cas communautaires. La date déclarée de début des signes s'étendait du 1^{er} au 20 août 2012. L'âge moyen des cas était de 84 ans. Seule la fréquentation d'une zone géographique de 2,5 km de rayon centrée sur l'Ehpad fut retrouvée comme facteur commun à l'ensemble des cas. Un contrôle inopiné effectué le 20 août 2012 a montré une contamination de 7 000 000 UFC/L à *Lp1* d'une TAR située à Meudon. Un choc biocide était systématiquement effectué 48 heures avant les prélèvements de surveillance environnementale. Les 3 souches cliniques isolées et les souches environnementales de la TAR de Meudon étaient identiques.

Conclusion - recommandations : Les investigations indiquent que la source la plus probable de contamination était cette TAR de Meudon au moins pour une partie des 8 cas (identité et rareté des souches cliniques et environnementales, concordance des données climatologiques, zone géographique limitée). Dans un contexte d'évolution réglementaire de la surveillance des TAR, il serait souhaitable de maintenir une fréquence à minima mensuelle de contrôle. Cet épisode souligne également le manque de représentativité possible des prélèvements de surveillance environnementale en cas de désinfection systématique préalable.



M. MEKKOUR

Legionella pneumophila et légionellose : épidémiologie, incidence et état des lieux au Maroc.

MEKKOUR MARIAM^{ab*}, BEN DRISS EL KHALIL^b, TAI JALILA^{ac} et COHEN NOZHA^a

^a Division de Microbiologie et Hygiène des Aliments et de l'Environnement, l'Institut Pasteur du Maroc -Casablanca, Maroc.

^b Laboratoire Diversité et Conservation des Systèmes Biologiques, Faculté des Sciences de Tétouan, Maroc.

^c Laboratoire de Biotechnologie, de l'Environnement et de la Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan II-Mohammedia, Maroc

* Corresponding author phone number: + 212 610 394 117

E-mail address: m.mariam06@gmail.com

Legionella (particulièrement l'espèce *Legionella pneumophila*) est une bactérie pathogène, responsable de la maladie du légionnaire ou légionellose qui sont des infections pulmonaires aiguës pouvant être nosocomiales ou communautaires. *Legionella pneumophila* a la particularité de se multiplier surtout dans les milieux hydriques ou humides créés par l'homme.

L'épidémiologie se préoccupe des relations s'établissant entre l'hôte qui est la personne touchée, l'environnement et l'agent infectieux. Les connaissances accumulées dans ces trois domaines permettent ensuite de proposer des mesures ayant pour objectif la diminution de l'incidence de la maladie par des actions notamment sur l'environnement rendant le milieu défavorable à la prolifération de cette bactérie.

De même, la prévention de la légionellose repose sur une surveillance clinique et environnementale. Le présent travail porte sur la mise au point des systèmes de surveillance et l'état épidémiologique de légionellose au Maroc pour mieux comprendre les déterminants de la maladie afin d'en limiter à terme l'impact sur les populations exposées.

Mots clés : Eaux chaude sanitaire ; épidémiologie ; infection ; Legionella pneumophila ; légionellose ; Maroc.

Incidence and Risk Factors of *Legionella pneumophila* Pneumonia During Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy : A Prospective French Study.



F. LANTERNIER

LANTERNIER F, TUBACH F, RAVAUD P, SALMON D, DELLAMONICA P, BRETAGNE S, COURET M, BOUVARD B, DEBANDT M, GUEIT I, GENDRE JP, LEONE J, NICOLAS N, CHE D, MARIETTE X and LORTHOLARY O

Objective : Our objective was to describe the incidence and risk factors of legionellosis associated with tumor necrosis factor (TNF)- α antagonist use. cover legionellosis.

Methods : From February 1, 2004, to January 31, 2007, we prospectively collected all cases of legionellosis among French patients receiving TNF- α antagonists in the Research Axed on Tolerance of Biotherapies (RATIO) national registry. We conducted an incidence study with the French population as a reference and a case-control analysis with four control subjects receiving TNF- α antagonists per case of legionellosis.

Results : Twenty-seven cases of legionellosis were reported. The overall annual incidence rate of legionellosis for patients receiving TNF- α antagonists, adjusted for age and sex, was 46.7 (95% CI, 0.0-125.7) per 100,000 patient-years. The overall standardized incidence ratio (SIR) was 13.1 (95% CI, 9.0-19.1; $P < .0001$) and was higher for patients receiving infliximab (SIR, 15.3 [95% CI, 8.5-27.6; $P < .0001$]) or adalimumab (SIR, 37.7 [95% CI, 21.9-64.9; $P < .0001$]) than etanercept (SIR, 3.0 [95% CI, 1.00-9.2; $P = .06$]). In the case-control analysis, exposure to adalimumab (OR, 8.7 [95% CI, 2.1-35.1]) or infliximab (OR, 9.2 [95% CI, 1.9-45.4]) vs etanercept was an independent risk factor for legionellosis.

Conclusions : The incidence rate of legionellosis for patients receiving TNF- α antagonists is high, and the risk is higher for patients receiving anti-TNF-monoclonal antibodies than soluble TNF-receptor therapy. In case of pneumonia occurring during TNF- α antagonist therapy, specific urine antigen detection should be performed and antibiotic therapy should

Caractéristiques épidémiologiques associées spécifiquement aux *sequence-type* (ST) de *legionella pneumophila* serogroupe 1 (2008-2012).



P. CASSIER

PIERRE CASSIER¹, CHRISTINE CAMPESE², YANN LE STRAT², DIDIER CHE² ET SOPHIE JARRAUD¹

¹ Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, France, ² Institut National de Veille Sanitaire Saint Maurice, France

En France, environ 1200 cas de légionellose sont notifiés chaque année et la très grande majorité d'entre eux sont dûs à *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 (Lp1). Depuis 2000, une souche est disponible dans environ 20% des cas identifiés et depuis 2008, le génotypage des souches par Sequence Based Typing est réalisé. On distingue ainsi 3 ST majoritaires en France : ST1, ST23 et ST47. L'objectif de notre travail était de voir si ces ST étaient associés à des facteurs de risque ou des caractéristiques spécifiques.

Les cas de légionellose à Lp1 déclarés entre 2008 et 2012, pour lesquels une souche a été isolée, ont été inclus dans notre étude. Une analyse multivariée par régression de Poisson a permis de calculer des Incidence Rate Ratio (rapports de taux d'incidence) et d'identifier des caractéristiques clinico-épidémiologiques spécifiquement associées à un ST. La répartition géographique des cas a également été étudiée.

Au total, 1217 patients ont été inclus dans l'étude et les souches isolées étaient respectivement ST1 (n=111), ST23 (n=241), ST47 (n=124) ou d'un autre ST (n=741). Comparé aux souches ST23, le profil ST1 était associé significativement à une infection nosocomiale (IRR=2,63 ; $p < 10^{-3}$) et à un traitement par corticostéroïdes (IRR=1,73 ; $p < 10^{-3}$) comme observé pour les souches ST47 (IRR=1,65 ; $p = 0,02$). Par ailleurs, comparées aux autres ST, les souches ST1 étaient de nouveau associées à des infections survenant en établissement de santé (IRR=3,4 ; $p < 10^{-3}$) ou en maison de retraite (IRR=2,3 ; $p < 0,03$). Par rapport au groupe des autres ST, les souches ST23 étaient quant à elles, statistiquement non associées aux cas

liés à un voyage (IRR=0,63 ; $p = 0,008$) et dans une moindre mesure à une corticothérapie (IRR=0,54 ; $p = 0,047$). Concernant la répartition géographique des cas, les 3 ST majoritaires présentent des profils très différents : les cas ST1 sont principalement observés en Ile de France alors que les cas ST23 sont retrouvés sur l'ensemble de la France. Les cas ST47 sont majoritaires dans les régions du centre-est et du nord-est.

Malgré de nombreux cas de légionellose à Lp1 ST23, ceux-ci ne se révèlent finalement pas significativement associés à un facteur de risque particulier comparés aux autres ST, mis à part la non-exposition aux corticoïdes. Néanmoins, ces résultats renforcent le fait que les infections à Lp1 ST1 surviennent plus fréquemment à l'hôpital ou en maison de retraite comme observé dans d'autres études. Enfin, la répartition géographique des cas nécessite des investigations complémentaires pour expliquer ces différences.

Cette étude permet aussi de rappeler l'importance des prélèvements respiratoires pour documenter les cas et ainsi améliorer les connaissances sur la légionellose.

Prévention de légionellose nosocomiale, patients « à risques » : vers le risque nul ?



S. GARDES

S. GARDES², S. COUDRAIS², M. REYROLLE¹, J. DROGUET³, S. JARRAUD¹ et R. GIRARD²

¹ Centre National de Référence des Légionelles INSERM U851 GHE HCL

² Unité d'Hygiène et d'Epidémiologie CHLS HCL

³ DAT HCL

La prévention des cas nosocomiaux de légionellose reste un problème de santé publique car la mortalité peut atteindre 20% pour les patients immunodéprimés. La législation permet théoriquement de gérer le risque car elle exige l'absence de *L. pneumophila* (L p) dans l'eau chaude sanitaire des services de patients à haut risque (HR) (1). Quand l'eau d'un hôpital est colonisée dès son ouverture le risque est majeur : en référence les 10 cas de légionellose en 2001 à l'Hôpital Européen George Pompidou. La construction d'un nouveau bâtiment dans un hôpital nécessite donc une réflexion multidisciplinaire et la mise en œuvre de mesures de prévention de la colonisation bactérienne des réseaux d'eau dès la conception du bâtiment (2).

Objectif : Le but de ce travail a été de prévenir et de maîtriser en continu la colonisation par *Legionella spp* (L spp) d'un nouveau bâtiment d'Hématologie de 42 chambres.

Méthodes : Le bâtiment a été construit avec le système Waterclean® (CIAT). La procédure CATREL a été appliquée dès la mise en eau du bâtiment. Pour le suivi analytique de l'eau : les *Legionella* ont été quantifiées par culture (NFT 90-431) et par PCR (NFT 90-471) ; la flore totale à 22°C et à 37°C ainsi que la présence de *Pseudomonas aeruginosa* (ISO 16266) ont été suivies. Des prélèvements mensuels et bi-mensuels ont été réalisés en 12 points témoins, dès la mise en eau, en décembre 2010, jusqu'à l'arrivée des patients en septembre 2011. Les prélèvements ont été poursuivis après l'arrivée des patients. Le diagnostic de légionellose pour les patients a été réalisé par détection d'antigène urinaire (BinaxNow®), culture et PCR pour les prélèvements cliniques.

Résultats : L'environnement : Décembre 2010-février 2012 : aucune *Legionella* n'a été détectée par culture ; le suivi en PCR a montré des valeurs de 10³ à 10⁴ Unités génomique par litre (UG/L) pour *L. spp*. Les résultats pour *L. p* sont toujours restés inférieurs à la limite de quantification (LQ) et souvent inférieurs à la limite de détection (LD).

Un cas de légionellose du à *L. anisa* a été diagnostiqué en février 2012 par PCR. Le patient, qui présentait une co-infection à H1N1 et *Aspergillus*, est décédé.

A la suite de ce cas, les douches et robinets des chambres ont été sécurisés par des filtres terminaux. Des purges quotidiennes ont été mises en place.

De février 2012 à aout 2013, plusieurs campagnes de prélèvements ont mis en évidence une colonisation croissante du réseau pour *L. spp*, aboutissant au maintien des filtres et à la réalisation de chocs chimiques répétés.

Conclusion : La législation exige l'absence de *L. p* dans les réseaux d'eau pour les patients à HR mais cette étude montre que *L. anisa* peut être également pathogène, même si seule la présence d'ADN est détectée. Pour les services avec des patients à HR, le suivi régulier de l'eau froide et de l'eau chaude sanitaire en PCR, avec des seuils <LQ pour *L. spp* et <LD *L. p* serait une exigence plus adaptée au risque des patients.

Références :

- 1 – 2010 Arrêté relatif à la surveillance des légionelles dans les ERP
- 2 – 2011 Legionella J. Freney et S. Jarraud Ed Lavoisier 243-271

Approche moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones chez *Legionella pneumophila*.



L. SHADOU

Lubana SHADOU^{1, 2}, Iyad ALMAHMOUD^{1, 2}, Sophie JARRAUD³, Jean François TIMSIT⁴, Dominique SCHNEIDER², Max MAURIN^{1, 2}

¹ Laboratoire de Bactériologie, IBP, CHU de Grenoble, Grenoble, France ;

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

³ CNR Legionella, Lyon ;

⁴ Réanimation Médicale, CHU de Grenoble

Tel. 04 76 76 54 79, Fax 04 76 76 52 28

mmaurin@chu-grenoble.fr

Les fluoroquinolones sont utilisées en première intention dans le traitement de la légionellose, et la sensibilité des *Legionella* aux fluoroquinolones est considérée comme constante à ce jour. Cependant, les échecs thérapeutiques rapportés chez les patients atteints de légionellose et traités par ces antibiotiques peuvent faire évoquer la possibilité de sélection *in vivo* de mutants résistants.

Nous avons sélectionné *in vitro* des mutants de *L. pneumophila* Paris résistants aux fluoroquinolones après plusieurs subcultures en présence de moxifloxacine. Les mécanismes sélectionnés chez ces mutants correspondent essentiellement à l'accumulation de mutations au niveau des gènes codant pour les topoisomérases (ADN gyrase et topoisomérase IV), cibles des fluoroquinolones. La résistance de haut niveau est associée à des mutations affectant les positions gyrA83 et gyrA87 du QRDR (quinolone resistance determining region) du gène *gyrA*, codant la sous-unité A de l'ADN gyrase.

Notre projet est de poursuivre ce travail par l'élaboration d'un test de PCR en temps réel permettant de détecter chez *L. pneumophila* les mutations de résistance précédemment caractérisées au niveau du gène *gyrA*, et si possible de les différencier par l'analyse de températures de fusion des amplifias obtenus. Pour atteindre cet objectif, nous avons tout d'abord validé ce test sur des souches de *L. pneumophila* : quatre souches de référence (Paris CIP 107629T, Philadelphia ATCC 33152, Lens CIP 108286 et Lorraine CIP 108729) ; et 3 mutants résistants aux fluoroquinolones sélectionnés à partir de la souche Paris, et présentant les mutations gyrA83 (T83I) pour la première souche, gyrA83 (T83I) + gyrA87 (D87 N) pour la

deuxième souche, et gyrA83 (T83I) + gyrA87* (D87H) pour la troisième. La spécificité de notre test de PCR en temps réel (nommé qPCR-LEGgyrA) a été évaluée sur 26 souches de référence de *Legionella* appartenant à 17 espèces autres que *L. pneumophila*, et 35 souches bactériennes appartenant à d'autres espèces que *Legionella* dont certaines sont responsables de pneumonies. Toutes les souches de *Legionella* proviennent du Centre National de Référence des *Legionella* (S. Jarraud, J. Etienne). Les souches appartenant aux autres genres sont des souches de référence ATCC ou des souches cliniques identifiées dans notre laboratoire par séquençage du gène codant l'ARNr16S.

Après optimisation, le test de qPCR-LEGgyrA que nous avons élaboré amplifie spécifiquement une portion du gène *gyrA* de l'espèce *L. pneumophila*, et permet de détecter à l'aide de sondes en tandem les mutations affectant les codons 83 et 87. Ce test permet donc de détecter les mutations *gyrA83* et *gyrA87* des mutants sélectionnés *in vitro* chez *L. pneumophila* Paris. Par rapport à la souche Paris sauvage, on observe une diminution d'environ 4°C de la température de fusion des amplifias obtenus pour le mutant *gyrA83* et de 8°C pour les doubles mutants.

Ce test est en cours d'évaluation à la fois sur des souches cliniques et environnementales de *L. pneumophila* pour la recherche de souches mutées naturelles. Il sera également utilisé pour la recherche de mutants *gyrA* directement dans divers prélèvements respiratoires prélevés chez des patients atteints de légionellose et hospitalisés au CHU de Grenoble entre 2006 et 2012. Certains de ces patients étaient en échec thérapeutique malgré un traitement par une fluoroquinolone.

Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides.



G. DESCOURS

GHISLAINE DESCOURS¹⁻⁶, CHRISTOPHE GINEVRA¹⁻⁶, FRANÇOISE FOREY⁶, JOËLLE CHASTANG⁶, NATHALIE JACOTIN⁶, JÉRÔME ETIENNE¹⁻⁶, GÉRARD LINA¹⁻⁶, PATRICIA DOUBLET¹⁻⁵ et SOPHIE JARRAUD¹⁻⁶

¹ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Equipe Pathogénèse des Légionelles, Université de Lyon, Lyon, France

² Inserm, U1111, Lyon, France

³ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

⁴ Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France

⁵ CNRS, UMR5308, Lyon, France

⁶ Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Légionelles, Lyon, France

O bjet de l'étude : La résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides a été décrite dès 1985 par Dowling. Notre objectif était de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides.

Méthodes : À partir de la souche de référence Paris, treize lignées ont été sélectionnées par passages successifs dans des milieux de culture liquides contenant de l'érythromycine ou de l'azithromycine. Un séquençage NGS du génome complet a été réalisé sur le dernier passage de chacune des lignées. La chronologie d'apparition des mutations a ensuite été déterminée par PCR spécifiques et séquençages à partir des passages intermédiaires.

Résultats : Nous avons sélectionné des populations de mutants présentant des CMI d'érythromycine ou d'azithromycine multipliées par 512 à 2048 par rapport aux CMI de la souche ancestrale. Les mutants résistants à l'érythromycine ont été obtenus plus rapidement (dès 9 passages) et présentent un niveau de résistance plus élevé que ceux résistants à l'azithromycine.

Nous avons identifié des substitutions et/ou des insertions/délétions sur les gènes codant les protéines ribosomales L4 et L22 et l'ARN ribosomal 23S. Chronologiquement, les premières mutations affectent les gènes *rpID* et *rpIV* codant les protéines

ribosomales L4 et L22 et sont associées à un bas niveau de résistance (CMI x 0,5 à 16). Des mutations additionnelles ou isolées sur les gènes codant l'ARN ribosomal 23S sont associées à un niveau supérieur de résistance (CMI x 2 à 2048). Le niveau de résistance est corrélé au nombre d'opérons mutés (1 à 3). Les mutants présentent une résistance croisée avec les autres macrolides, mais pas avec les fluoroquinolones, la rifampicine et la doxycycline. L'étude d'autres mutations identifiées par les séquençages génomiques totaux (gènes codant des protéines ribosomales et des pompes à efflux) est en cours.

Conclusion – Perspectives : *L. pneumophila* présente un fort potentiel d'acquisition de résistance aux macrolides. Nous avons développé des techniques moléculaires permettant la détection des mutations impliquées directement à partir de prélèvements cliniques. L'évaluation de la résistance de *L. pneumophila* aux macrolides sur des échantillons cliniques et des souches est actuellement en cours.



C. LOISEAU

Activité anti- *Legionella* de *Bacillus* sp.

C. LOISEAU¹, N. GIRARDIN¹, A. MARCHAND¹, C. BOUTELEUX², N. BERTHELOT³, F. DAVID³ et JM. BERJEAUD¹

¹ Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions UMR CNRS 7267 Equipe Microbiologie de l'Eau-Université de Poitiers

² EDF R&D - Département LNHE-Groupe Qualité des Eaux et Environnement-Chatoux

³ Véolia Recherche et Innovation, Maisons Laffitte

Introduction : L'espèce bactérienne *Legionella* est responsable de la légionellose. Cette bactérie colonise les milieux aqueux naturels (lacs et rivières) et les milieux aqueux 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 les gouttelettes du panache. Des traitements biocides sont aujourd'hui utilisés pour maintenir la concentration en légionelles inférieure à 103 UFC/L.

Le choix des biocides est un compromis entre leur efficacité envers les légionelles et le respect de l'environnement. Aussi la tendance actuelle est d'orienter le contrôle de la croissance des légionelles vers l'utilisation de composés d'origine biologique qui sont spécifiques de la cible et biodégradables.

Objet de l'étude : Caractérisation de l'activité anti-*Legionella* de deux souches de *Bacillus* sp. au niveau du mode d'action et de la nature des molécules antimicrobiennes produites.

Méthodes : L'activité inhibitrice de deux souches de *Bacillus* envers *L. pneumophila* Lens a été déterminée en réalisant des co-cultures dans des milieux contrôlés et dans de l'eau de TAR.

Les agents antimicrobiens sécrétés ont été partiellement purifiés par extraction en phase solide. Le mode d'action de ces extraits a été étudié, par inhibition de croissance en milieu liquide, par dénombrement ainsi que par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de Propidium (IP).

Résultats : Deux souches bactériennes, *B. pumilus*

NG1 et *B. subtilis* AM1, présentant une forte inhibition de croissance de *L. pneumophila* Lens ont été isolées au laboratoire. Leur activité anti-*Legionella* a été déterminée par co-culture avec *L. pneumophila* en milieu de culture (BYE). En eau physiologique, aucune inhibition de croissance de *L. pneumophila* n'a été constatée. En eau de TAR, les *Bacillus* ont montré une faible activité anti-*Legionella*.

L'extraction en phase solide du surnageant des *Bacillus* a permis d'obtenir des fractions actives contre *Legionella*. Une activité bactéricide des fractions de *B. subtilis* AM1 a été mise en évidence en milieu BYE, par dénombrement et par cytométrie en flux. En revanche aucune activité n'a été détectée en PBS ni en eau de TAR.

Conclusion : Les co-cultures légionelles/*Bacillus* réalisées ont montré qu'une inhibition de la croissance des légionelles est observée dans les milieux où les *Bacillus* sont métaboliquement actifs. En effet, en eau physiologique, où aucune activité anti-légionelles n'est détectée, les *Bacillus* ne croissent pas. Ces résultats ont permis de conclure qu'une molécule anti-*Legionella* était produite lors de la croissance des *Bacillus*.

Les fractions partiellement purifiées ont montré une activité bactéricide dans un milieu riche. Ces résultats permettent de supposer que la molécule n'agit que lorsque la bactérie cible est métaboliquement active, en bloquant irréversiblement sa croissance.

Afin de mieux caractériser la molécule inhibitrice, une HPLC en phase inverse, pour isoler la ou (les) molécule(s) d'intérêt, et une identification par spectrométrie en masse sont nécessaires.

Utilisation de la co-culture amibienne pour la détection de *Legionella* spp. dans l'environnement.



V. GAIA

VALERIA GAIA

Centre National de Référence pour Legionella – Bellinzona – Suisse

Introduction : Plusieurs auteurs ont décrit l'utilisation de la co-culture amibienne comme une méthode très utile pour l'isolement de *Legionella* spp. dans des échantillons cliniques et environnementaux. Cependant, la limite de détection pour la co-culture avec *Acanthamoeba polyphaga* n'est pas connue et aucune étude n'a pu comparer le taux de rendement entre la co-culture et la méthode de culture traditionnelle dans les échantillons environnementaux. Ce travail avait pour objectif de déterminer les limites de détection de ces deux méthodes pour *Legionella pneumophila*, dans des échantillons de compost et dans des échantillons d'air artificiellement contaminé. Co-culture et culture ont ensuite été utilisées pour la détection de *Legionella* spp. dans des échantillons prélevés dans l'environnement.

Méthode : Des échantillons de compost et d'air ont étéensemencés avec des concentrations connues de *L. pneumophila*. La culture directe et la co-culture avec des *Acanthamoeba polyphaga* ont été utilisées en parallèle pour la détection des légionelles. Des courbes standard ont ensuite été établies pour chaque type de matériel.

Résultats : La co-culture s'est montrée plus sensible par rapport à la culture, avec une limite de détection située entre 10^2 et 10^3 légionelles par g de compost ou par m^3 d'air, comparé à 10^5 - 10^6 légionelles par g de compost et par m^3 d'air pour la culture directe. L'analyse des échantillons prélevés dans l'environnement, a montré que la co-culture est plus performante, surtout lorsque les concentrations en légionelles sont très faibles, mais la variabilité des espèces récoltées est plus limitée par rapport à la

culture traditionnelle.

Conclusions : La co-culture amibienne est une méthode utile et sensible pour l'enrichissement de *L. pneumophila* dans des échantillons environnementaux qui contiennent des concentrations réduites de légionelles.

Evaluation of the infectivity of viable but non-culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment using macrophage-like U937 and HL-60 cells and *Acanthamoeba polyphaga*.



T. EPALLE

EPALLE T., GIRARDOT F., ALLEGRA S., MAURICE-BLANC C., POZZETTO B. ET RIFFARD S.

Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), EA 3064, SFR 413, Université de Lyon, 42023 Saint-Etienne, France

Bacteria of the genus *Legionella* are ubiquitous within natural and anthropic aquatic environments. *Legionella pneumophila*, the most frequently associated species with legionellosis - a pneumonia-like disease which has a case-fatality ratio of 20% - is known to invade and replicate within various protozoan species in environmental reservoirs as it grows in macrophages within the lung. Transmission to humans occurs through infectious aerosols from environmental sources. *L. pneumophila* is able to enter a non-replicative viable but non culturable (VBNC) state following different exposures to various stresses. We have previously shown that VBNC forms of *L. pneumophila* obtained after heat shock treatment at 70°C : (1) could be monitored by flow cytometry [1] and ; (2) are widespread in hospital water systems after heat treatment procedures aimed at reducing their numbers [2].

In order to investigate if these VBNC forms may be infectious for humans or for natural amoeba reservoirs, three *L. pneumophila* serogroup 1 strains of different origins (Philadelphia GFP 008, clinical 044 and environmental RNN) were shocked at different temperatures ranged from 50 to 70°C, for different times (5, 10, 30 and 60 minutes). VBNC forms were quantified by a flow cytometric assay (FCA) as previously described [1] and cultivated on BCYE agar medium then tested for their capability to infect and/or resuscitate on differentiated macrophage-like cell lines (U937 and HL-60) and *Acanthamoeba polyphaga*. The infection of differentiated macrophage-like cell lines (U937 and HL-60) and *Acanthamoeba polyphaga* was monitored by microscopic observations (internalization of bacteria, cells lysis) and resuscitation of VBNC (recultivation) following plating on BCYE agar medium. To know which temperature can only generate VBNC, all strains were shocked as described above and incubated with amoeba at MOIs of 10 or 100, without washing steps in pages' amoeba saline (PAS 1X) for 4 days at 30°C or 37°C and plated on BCYE at 37°C for 10 days.

The infection of macrophage-like cells was tested with VBNC generated at different temperatures for 5, 10, 30 or 60 min and co-cultured with cells at 37°C, under 5% CO₂, in Hank's Balance Salt Solution (HBSS) without washing steps for 4, 6 and 10 days (MOI 1:1). As control, unshocked cells of all *L. pneumophila* strains were systematically co-cultured under the

same conditions.

After 30 minutes at 60°C, VBNC forms could be detected for all *L. pneumophila* strains tested. All these VBNC forms could be resuscitated after culture on *Acanthamoeba polyphaga* but not on macrophage-like cells. Under other conditions of temperature and times of exposure, each *L. pneumophila* strain exhibited a specific response related to its potential to enter into a VBNC state.

Upon a 70°C heat shock [3], VBNC forms were systematically detected after 5 min of treatment (10 to 23% of VBNC depending on the strains). Cells shocked for 5 min (Lp 008) or 30 min (Lp 044 and Lp RNN) were still able to infect amoeba (lysis of cells and resuscitation). However, no resuscitation or cell lysis was evidenced when using U937 and HL-60 cells despite the use of various contact times and culture media.

Our results suggest that heat-generated VBNC forms of *L. pneumophila* are not infectious for macrophage-like cells *in vitro* at a MOI 1:1, whatever the conditions used for their interaction although resuscitation is still possible using amoeba.

There is still a need to investigate if such VBNC forms can be resuscitated on primary culture cells (monocytes isolated from peripheral blood mononuclear cells). Other environmental parameters should also be tested for their capabilities to generate VBNC forms that may be in such a state that they would have the potential to infect and kill human cells. Finally, our preliminary results on the infection of macrophage-like cells following amoebal resuscitation of heat-treated VBNC forms suggest that such VBNC forms may become infectious for humans following a previous interaction with amoeba (at least *Acanthamoeba polyphaga*).

Keywords : Legionella pneumophila ; VBNC ; amoeba, macrophage-like ; resuscitation ; infectivity.

References :

- [1] Allegra et al. Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74 : 7813-7816
- [2] Allegra et al. Appl. Environ. Microbiol. 2011, 77: 1268-1275.
- [3] Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243 du 22 avril 2002

Nouvelle méthode rapide de détection / dénombrement / enrichissement / isolement des *Legionella pneumophila* vivantes.



S. DUKAN

JORDI MAS PONS¹, AUDREY DUMONT², GRÉGORY SAUTEJEAU¹, EMILIE FUGIER², AURÉLIE BARON¹, SAM DUKAN², BORIS VAUZEILLES^{1,3}

¹ Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

² Aix Marseille Université, Laboratoire de Chimie Bactérienne (UMR 7283), Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier - 13402 Marseille, France

³ CNRS et Université Paris-Sud, Laboratoire de Synthèse de Biomolécules, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, UMR 8182, 91405 Orsay, France
sophie@pecastaings.net

Régulièrement de nouvelles épidémies nous rappellent l'important impact sanitaire et économique que les infections bactériennes peuvent avoir sur nos sociétés. Or, le dénombrement et l'identification des bactéries cultivables, enjeu essentiel dans un contrôle qualité microbiologique efficace, nécessitent, suivant les bactéries, jusqu'à plusieurs semaines. Cette attente, entre le prélèvement et le résultat, est trop longue pour envisager une action rapide. Ainsi, de nombreuses méthodes alternatives ont vu le jour permettant d'obtenir ces informations, le plus souvent en moins d'une journée. Cependant, ces méthodes alternatives donnent, le plus souvent, des résultats qui surestiment la concentration effective en bactéries réellement cultivables qui sont les seules prises en compte dans les normes sanitaires. Cela est notamment le cas avec la seule méthode AFNOR alternative à la culture, permettant de dénombrer les *Legionella pneumophila*, la PCR quantitative en temps réel. Outre les problèmes d'inhibiteurs de la PCR et de seuil de sensibilité, cette méthode basée sur la présence de fragments d'ADN spécifique à *L. pneumophila*, ne permet pas de différencier les bactéries cultivables des bactéries mortes ou viables mais non cultivables. Ce test surestime donc la concentration en LP capables de se multiplier (Delgado-Viscogliosi et al., 2009, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 3502.).

Suite à cette constatation et comme l'atteste la publication dans le journal *Angewandte Chemie International*

Edition (2012, 51, 3143-3146) nous venons d'apporter la preuve de concept d'une nouvelle méthode alternative permettant simultanément d'isoler, détecter et dénombrer des bactéries Gram-négatives (Gram-) cultivables d'intérêt. L'originalité de cette méthode tient dans l'utilisation d'un monosaccharide portant une fonction chimique reportrice qui, une fois assimilé **uniquement par les bactéries cultivables**, sera révélé par click-chemistry.

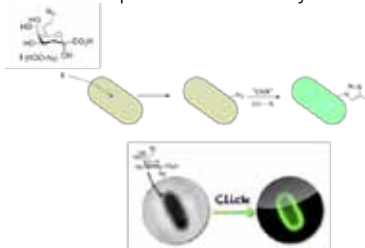


Figure 1 : Après assimilation d'un sucre modifié (ici le KDO-N₃) uniquement par les bactéries cultivables, le KDO-N₃ constituant essentiel du lipopolysaccharide se retrouvera à l'extérieur de la cellule. Par la suite, via une réaction de type « click-chemistry », il sera possible d'accrocher notamment un marqueur fluorescent permettant la visualisation des bactéries d'intérêts.

Fort de cette preuve de concept, nous présenterons les derniers résultats liés à l'application de cette technologie dans le cas de *L. pneumophila*.



G. GREUB

Légionelles : de l'usine de traitement d'eau au robinet.

Gilbert GREUB

Lausanne, Suisse

Les Légionelles représentent une large diversité d'espèces de pathogénicité variable, qui peuvent être associées à des infections respiratoires parfois sévères. Dans ce contexte, et compte tenu de leur prévalence significative dans les réseaux d'eau potable, il est important de veiller à maintenir leur quantité dans des proportions raisonnables et en dessous des seuils recommandés.

Ainsi, les fabricants d'eau potable, tel que SUEZ, qui gèrent la qualité de l'eau potable considèrent à juste titre le contrôle des Légionelles comme un axe prioritaire de recherche. Cette recherche, pour être complète doit également s'intéresser aux amibes libres, puisque ces protistes jouent le rôle de réservoir, niche évolutive et cheval de troie pour les bactéries internalisées.

Dans ce contexte, nous avons développé une étroite collaboration avec SUEZ afin de mieux comprendre les interactions entre Légionelles et amibes et, dans le cadre de mandats successifs, avons pu tirer quelques observations d'une part sur l'importance des amibes dans l'écologie des Légionelles puis également sur l'utilisation des amibes comme milieu de culture.

Ces travaux permettent de proposer quelques pistes sur les méthodes de décontamination et de traitement de l'eau, au sein de l'usine de traitement et en aval, au point d'usage.

Stabilité spatio-temporelle des souches de *L. pneumophila* dans l'environnement.



P. LE CANN

P. Le Cann¹, G. Robaldo^{1,2}, J. F. Guegan², S. Jarraud^{3,4} et C. Pourcel⁵

¹EHESP (École des Hautes Études en Santé Publique) INSERM U1085, Avenue du Professeur Léon-Bernard, 35043 Rennes, France,

²Dynamique des Systèmes et maladies Infectieuses, IRD, Montpellier, 3Université de Lyon, France, Centre National de Référence des Legionelles,

³INSERM, U851,

⁴Hospices Civils de Lyon, France, ⁵Univ Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, Orsay.

*E.mail correspondant : Pierre.Lecann@ehesp.fr

Introduction : *Legionella pneumophila* est l'agent étiologique de la légionellose, maladie respiratoire dont la forme la plus grave se traduit par une pneumopathie aigüe parfois mortelle. Cette bactérie hydro-tellurique thermophile présente la particularité de coloniser aussi bien les eaux naturelles que les milieux hydriques artificiels comme les circuits des tours aérorefrigérantes ou les réseaux d'eaux chaudes sanitaires.

Objet de l'étude : Pour essayer de comprendre l'évolution spatio-temporelle des *L.pneumophila*, plus de 1200 souches collectées depuis 2000 dans le cadre du suivi sanitaire des eaux du département d'Ille et Vilaine dans la région rennaise ont été analysées.

Méthodes : Cette collection a été caractérisée par la méthode MLVA pour Multiplex capillary-based Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analysis. Douze locus sont amplifiés simultanément et le typage d'une souche ne requière ainsi qu'une seule réaction d'amplification PCR et une analyse sur un seul capillaire.

Résultats : Mille deux cent cinquante-huit souches environnementales collectées entre 2000 et 2012 dans le département d'Ille et Vilaine et 5 souches cliniques collectées pendant les épidémies de légionellose de 2000 et 2006 ont été analysées. Les résultats montrent une stabilité des souches

de *Legionella pneumophila*, à la fois dans l'espace et dans le temps. En effet, dans le réseau d'eau chaude de l'agglomération rennaise, on retrouve une souche majoritaire (appartenant au ST59) présente sur tous les points investigués et ceci depuis 2000, représentant 77% des isolats. Cette souche n'a jamais été impliquée dans une épidémie de légionellose en France. Par contre, dans les tours aérorefrigérantes, on retrouve une autre souche, faisant partie du groupe Paris (ST1), qui elle, a été retrouvée dans plusieurs épidémies, mais pas dans les épidémies de Rennes. Dès que l'on change d'agglomération, et de système d'alimentation en eau, on retrouve une autre souche majoritaire. Des travaux préliminaires montrent que ces souches sont plus résistantes au chlore que les souches de référence.

Conclusion : Ces résultats montrent la présence quasi systématique des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire. Pour éviter les cas de légionellose, il faut maintenir les populations de *Legionella pneumophila* à un niveau suffisamment bas par une bonne gestion de l'hydraulique, de la température et des traitements biocides des réseaux et des équipements.

Retour sur : The 8th International Conference on Legionella 2013 (Melbourne, Australie, 29 octobre au 1^{er} novembre 2013).



L. GOMEZ-VALERO

Laura GOMEZ-VALERO

Institut Pasteur, Biologie des Bactéries Intracellulaires, Paris, France and CNRS URA2171, Paris, France

L'auteur nous rapporte des points importants de ce colloque international sur les *Legionella*.

Population genomics and evolution of virulence of *Legionella*.



C. BUCHRIESER

RUSNIOK C^{1,2}, GOMEZ-VALERO L^{1,2}, GINEVRA C³, Ma L⁴, BOUCHIER C⁴, JARRAUD S³ and BUCHRIESER C^{1,2}

¹ Institut Pasteur, Biologie des Bactéries Intracellulaires and

² CNRS URA 2171, Paris France

³ Centre National de Référence des légionelles (CNRL), Hospices Civils de Lyon, Groupe Hospitalier Est, 69 677 Bron Cedex, France,

⁴ PF1, Plateforme génomique, Institut Pasteur, Paris, France

Among the 53 *Legionella* species described to date, *Legionella pneumophila* and *Legionella longbeachae* are the ones most frequently isolated from Legionnaires' disease cases. Interestingly, *L. pneumophila* is associated with 90% of human disease and within the 15 serogroups (Sg), *L. pneumophila* Sg1 causes over 84% of Legionnaires' disease worldwide. Among the Sg1 strains a pandemic clone, *L. pneumophila* strain Paris, and newly emerging endemic clones like strain Lorraine have been identified. Why *L. pneumophila* Sg1 is so predominant is unknown. We have used high throughput sequencing and comparative genomics of 50 *L. pneumophila* isolates belonging to the 15 serogroups present within the species to get insight in the evolution of virulence of *Legionella* and the evolution of the species *L. pneumophila* in particular. Furthermore, we have sequenced and analysed 30 isolates of clone Paris, Lorraine and ST23 each. By a comprehensive, comparative analysis of the 140 *L. pneumophila* genome sequences we show that these three clones have recently emerged. A phylogenetic analysis based on single nucleotide polymorphisms revealed the phylogenetic relationships within the species and allowed to analyses gain and loss of virulence factors like secreted proteins and eukaryotic like proteins. A systematic phylogenetic analysis of eukaryotic like genes demonstrated that several have been acquired by lateral gene transfer probably from protozoa, the natural host of *Legionella*. Thus horizontal gene transfer between domains of life has

contributed to the adaptation of *Legionella* to its intracellular replication niche and to the emergence of this human pathogen from the environment.

Genetic exchanges between *Legionella*, its amoebal host and other intracellular bacteria.



C. BERTELLI

CLAIRE BERTELLI^{1,2}

¹ Center for Research on Intracellular Bacteria, Institute of Microbiology, University Hospital Center and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland;

² Vital-IT group, Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland.

Horizontal gene transfer (HGT) is considered a key mechanism of genome evolution through all kingdom of life. Amoebae act as an evolutionary crib that may favor genetic exchanges by bringing in close proximity different amoeba-resisting bacteria (ARBs). The larger genome size of amoebal pathogens compared to their human-infecting relatives was proposed to result from extended gene acquisition instead of genome reduction as observed in strict human pathogens. The sequencing of *Legionella drancourtii* offered the opportunity to investigate the occurrence of LGTs between intra-amoebal pathogens, and more specifically with *Parachlamydia acanthamoeba*, a member of the *Chlamydiales* order. Phylogenetic reconstructions enabled to identify seven HGTs between *L. drancourtii* and *P. acanthamoebae*. More widely, several potential HGTs between members of the *Legionellales* and *Chlamydiales* orders and other amoeba-infecting bacteria were detected. In addition to this, the amoebae graze on bacteria and often harbor amoeba-resisting endosymbionts thus offering opportunities to acquire and give foreign DNA by transfer between bacteria and their host. The recent genome sequencing of the first free-living amoeba, *Acanthamoeba castellanii*, provided the opportunity to investigate the occurrence of HGTs between *Acanthamoeba* and its resisting microorganisms.

Genetics of competence for natural transformation in *L. pneumophila*.



X. CHARPENTIER

Pierre-Alexandre JUAN^{1,2}, Aïda BOUGHAMMOURA^{1,2}, Romain BRUNEL^{1,2} and Xavier CHARPENTIER^{1,2}

¹ CNRS UMR5240,

² Université Claude Bernard Lyon, Villeurbanne, France

Competence is a genetically programmed physiological state that confers bacteria the ability to take up DNA from the environment and allows subsequent genetic and phenotypic transformation. The competence state involves expression of a composite multiprotein DNA uptake machinery to actively import exogenous DNA. *Legionella pneumophila* is competent for naturally transformation and its genome shows numerous trace of foreign genetic material.

In *L. pneumophila* competence is not permanent, i.e. synthesis and assembly of a putative DNA uptake machinery is a transient and regulated process. How competence is regulated is not known and none of the regulators of competence development identified in model organisms are present in this species. In addition the components of its DNA uptake system have not been identified. Although the genetic control of competence is not understood several mutants in which competence is constitutive have been previously reported. We have used RNAseq transcriptional profiling to reveal in these mutants a small regulon encoding the putative components of the DNA uptake machinery. Mutational analysis of the regulon shows that most genes are indeed involved in natural transformation. In addition, and unexpectedly, we found that absence of specific components of the DNA uptake machinery alter the ability of *L. pneumophila* to infect both protozoan and mammalian cells.

Essentialité du tmRNA pour la croissance et la virulence de *Legionella pneumophila*.



R. BRUNEL

R. BRUNEL*, X. CHARPENTIER*

*Equipe « Signalisation et génétique de la compétence des bactéries pathogènes », UMR 5240 « Microbiologie, Adaptation, Pathogénie », Bâtiment Lwoff 3e étage, 10 rue Raphaël Dubois, Villeurbanne, France

Introduction : La trans-traduction est un mécanisme de sauvetage du ribosome présent chez l'ensemble des procaryotes. Elle est opérée par l'action conjointe d'un ARN non-codant (**tmRNA**) et de protéines adaptatrices (SmpB, EF-Tu). Elle permet la libération des sous-unités ribosomiques lors d'un blocage traductionnel, ainsi que l'adressage actif du peptide avorté aux protéases. Ce mécanisme a été associé à la tolérance de certaines espèces bactériennes aux antibiotiques ayant pour cible le ribosome. Chez la plupart des espèces bactériennes, des mécanismes alternatifs existent pour compenser une éventuelle perte de la fonction de trans-traduction.

Objet de l'étude : Le mécanisme de trans-traduction n'avait pas été jusqu'alors étudié chez *Legionella pneumophila*. Les mécanismes alternatifs semblent manquants chez cette espèce. Notre but était donc de vérifier si la trans-traduction y est essentielle, et d'étudier le potentiel de ce mécanisme en tant que nouvelle cible thérapeutique.

Méthodes : Un mutant conditionnel du gène codant pour le tmRNA (*ssrA*) a été réalisé chez la souche *L. pneumophila* Paris, et les phénotypes associés à l'arrêt de l'expression de ce gène ont été étudiés.

Résultats : Nous avons confirmé l'essentialité du tmRNA pour la croissance axénique et la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila*. L'absence de mécanisme de trans-traduction fonctionnel conduit rapidement à un arrêt de la division cellulaire, associé à des modifications morphologiques importantes (élongation cellulaire) et à une mortalité cellulaire. De façon plus surprenante, le stress provoqué par

l'inactivation de la trans-traduction semble également provoquer des dommages à l'ADN. Le rôle supposé de la trans-traduction dans la résistance à certains traitements antibiotiques a également pu être confirmé. Nous avons découvert que même une simple diminution du niveau d'expression du gène *ssrA* permettait d'augmenter significativement l'efficacité de certains antibiotiques, dont l'érythromycine, l'antibiotique recommandé dans le traitement la légionellose.

Conclusion : Le mécanisme de trans-traduction est essentiel à la croissance et la virulence de *Legionella pneumophila*. De plus, l'inactivation de ce mécanisme permet de potentialiser *in vitro* l'action du traitement antibiotique de référence de la légionellose. Il constitue donc une cible de choix pour le développement de nouveaux traitements anti-infectieux.

Comparative analysis of type iv secretion systems (t4ass) in 42 *legionella pneumophila* strains of different serogroups.



A. KHODR

AHMAD KHODR, CHRISTOPHE RUSNIOK, LAURA GOMEZ-VALERO AND CARMEN BUCHRIESER

Institut Pasteur, Biologie des Bactéries Intracellulaires, Paris, France and CNRS URA2171, Paris, France

Abstract : Replication of *Legionella pneumophila* (*Lp*) in fresh water protozoa seems to provide a unique environment for gene exchange between *Legionella*, between different bacteria but also between bacteria and the eukaryotic cell. Indeed, HGT and mobile genetic elements (MGEs) are a major generator of genome plasticity and diversity among *Legionella* species. When integrated in the recipient genome these MGEs are usually bordered by flanking repeats, a situation found in many of the T4ASSs encoded in the *Legionella* genomes. Furthermore, hybridization studies indicated a heterogeneous distribution. Thus, the T4ASSs (*Lvh*, *P-type* and *F-type*) seem to be mobile and contribute to the observed genome plasticity. To assess their diversity in more details, we have sequenced 42 *Lp* strains belonging to 15 different serogroups and have performed an in depth analysis of the distribution and organization of T4ASSs.

We identified, the presence of new and unique combinations of T4ASS in certain of these genomes but also strains lacking T4SSAs completely. Detailed analysis of the *Lvh* locus revealed the conservation of the entire integrative plasmid like element pP36 (*Lvh* and the flanking regions) in the epidemic clone Paris and the conservation of only the *Lvh* encoding region without the flanking elements in the other strains. This distribution indicates that the T4ASS are transferred horizontally by different phages. Mobility of the different elements was assed by conjugation and different conditions were tested to analyze when the presence of these MGEs confers an advantage to *Lp*.



Y. HÉCHARD

Biofilms et *legionella* : des relations complexes.

Yann HÉCHARD

Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Eq. Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, France

Dans l'eau, la majorité des bactéries sont retrouvées dans le biofilm. Ce dernier est un environnement considéré comme favorable car riche en nutriments, présentant un support stable et protégeant en partie des molécules antimicrobiennes présentes dans l'eau.

Les facteurs favorisant l'implantation et la multiplication de *L. pneumophila* au sein du biofilm sont encore mal connus. La plupart des études décrivent le comportement de *L. pneumophila* dans des biofilms monoespèce alors que le biofilm est un environnement complexe et *L. pneumophila* fait partie des bactéries très minoritaires.

Le facteur primordial semble être la présence d'amibes. Les amibes sont des protozoaires bien décrits comme étant des « incubateurs » à *L. pneumophila*. Cependant le terme amibes regroupe un grand nombre de genre et d'espèces assez éloignés phylogénétiquement et la question se pose de la permissivité de ses amibes. Parallèlement, la croissance de *L. pneumophila* à l'extérieur des amibes est décrite comme marginale.

La biodiversité bactérienne au sein du biofilm peut avoir une influence. Par exemple, il a été montré que *L. pneumophila* ne pouvait pas s'implanter dans un biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. Mais il est possible que certaines bactéries soient au contraire favorables.

Ensuite, l'état physiologique de la bactérie est aussi évidemment important. Plusieurs études ont montrées que des *L. pneumophila* en phase stationnaire se fixaient mieux que des cellules en phase répliative. De même, le passage dans les amibes semble

favoriser l'implantation ultérieure dans les biofilms. Enfin, les caractéristiques physico-chimiques de l'eau ont un impact sur le développement de *L. pneumophila*. La température est clairement un critère modulant sa multiplication. Nous verrons plus particulièrement le rôle du fer qui est un élément essentiel au développement de la bactérie.

En conclusion, le développement de *L. pneumophila* dans les biofilms est multifactoriel. Les recherches devraient être plus orientées vers des systèmes plus proches de la réalité des réseaux afin de mieux comprendre l'écologie de *L. pneumophila* et de mieux décrire les facteurs qui, *in situ*, favorisent ou limitent la croissance de cette bactérie.

Analyse du rôle des enzymes de synthèse et de dégradation du di-GMPc dans le contrôle de la formation de biofilms par *Legionella pneumophila*.



S. PÉCASTAINGS

S. PÉCASTAINGS¹, J. ALLOMBERT², P. DOUBLET², C. ROQUES¹ et A. VIANNEY²

¹ Université Paul Sabatier, Laboratoire de Génie Chimique-UMR5503, département BioSYM, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, France

² Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111-CNRS 5308-UCBL-ENS, Bâtiment Lwoff, 10 rue Dubois, 69622 Lyon, France

Les réseaux d'eau hébergent des biofilms, communautés bactériennes fixées sur un substrat et incluses dans une matrice extracellulaire, conférant une protection aux bactéries. Ces biofilms sont à l'origine du maintien de *L. pneumophila* dans des réseaux d'eau malgré des désinfections fréquentes. La maîtrise du risque lié à *L. pneumophila* nécessite donc de comprendre les mécanismes contrôlant la formation du biofilm.

Le di-GMP cyclique (di-GMPc) est un second messager bactérien ubiquitaire impliqué dans de nombreuses voies de régulation (cycle cellulaire, virulence etc.). Chez de nombreuses espèces, le di-GMPc est également impliqué dans la transition entre phases planctonique et sessile (biofilm). La synthèse et la dégradation du di-GMPc sont contrôlées par des diguanylate cyclases (DGC, à motif GGDEF) et des phosphodiesterases (PDE, à motif EAL) respectivement. Un grand nombre de ces enzymes comportent également des domaines senseurs permettant la régulation fine du taux de di-GMPc en réponse aux signaux environnementaux. Le but de ce projet est de caractériser les voies de signalisation impliquant le di-GMPc et contrôlant la formation de biofilm par *L. pneumophila*.

La souche *L. pneumophila* Lens, responsable de la plus importante épidémie en France, possède 22 gènes codant pour des protéines à motifs GGDEF/EAL : 20 ont été inactivés dans cette étude. La capacité à former un biofilm des souches inactivées a été testée par un modèle de formation de biofilm en milieu appauvri. La densité bactérienne (qPCR et vPCR) et la structure tridimensionnelle du biofilm (microscopie confocale) ont été comparées à celles de la souche sauvage. Les

altérations de la formation de biofilm en lien avec le métabolisme du di-GMPc sont en cours de validation par complémentation fonctionnelle. La détermination de l'activité enzymatique des protéines à domaines GGDEF/EAL étudiées est en cours.

Neuf souches présentent un défaut de formation de biofilm (plus faible densité de bactéries adhérees que chez la souche sauvage). Deux souches forment des biofilms plus hauts et plus denses que la souche sauvage. Les expériences de complémentation montrent un retour au phénotype sauvage pour 5 souches. Alors que de fortes concentrations en di-GMPc intracellulaires sont généralement corrélées à la formation de biofilm, les tests d'activités enzymatiques montrent qu'une DGC pourrait être spécifiquement associée à l'inhibition de la formation du biofilm et qu'une PDE pourrait être associée à une augmentation du biofilm. Une protéine présentant à la fois les 2 activités DGC et PDE semble être impliquée dans l'inhibition de la formation du biofilm. Ces résultats doivent être confrontés aux dosages du di-GMPc intracellulaire chez les souches inactivées -en cours- mais ils suggèrent déjà que *L. pneumophila* utiliserait des voies de signalisation à di-GMPc spécifiques, s'appuyant sur une variation locale de la concentration en di-GMPc pour contrôler la formation de biofilms.

Ces résultats montrent que des protéines à motifs «GGDEF/EAL» sont impliquées dans la formation de biofilms par *L. pneumophila*. Les résultats obtenus permettront de caractériser les voies de signalisation et les signaux environnementaux associés impliqués spécifiquement dans la formation du biofilm.

La réplication chez *acanthamoeba castellanii* active le développement et la formation de biofilm et induit un chimiotactisme chez *legionella pneumophila*.



R. BIGOT

R. BIGOT¹, J. BERTAUX², J. FRÈRE¹ ET J.-M. BERJEAUD¹

¹ Laboratoire de Microbiologie de l'Eau (E.B.I.), 1 Rue Georges Bonnet, 86000 Poitiers

² Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose (E.B.I.), 1 Rue Georges Bonnet, 86000 Poitiers

renaud.bigot@univ-poitiers.fr

Introduction : Les légionelles, bactéries pathogènes pour l'Homme, contaminent les biofilms des réseaux d'eaux chaudes et les circuits de refroidissement. Ces biofilms constituent un réservoir de contamination qui favorise la persistance de ces bactéries même après application de traitements visant leur éradication. Les légionelles se multiplient dans les protozoaires et contaminent les biofilms après propagation dans leurs hôtes eucaryotes.

Objectif d'étude : Effet de les conditions de multiplication des légionelles sur leur implantation dans les biofilms et leur association éventuelle à d'autres bactéries afin d'en étudier l'impact sur les mécanismes de survie aux traitements.

Méthode : Dans cette étude, nous avons utilisé quatre souches, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Empedobacter brevis* et *Pseudomonas aeruginosa*, retrouvées fréquemment dans les réseaux d'eaux sanitaires afin de développer des biofilms maîtrisés. Après 15 jours, de culture, ces biofilms sont inoculés avec des légionelles issues de différentes conditions de culture. Après 7 jours, les biofilms sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé d'un apotome, module permettant une microscopie à illumination structurée.

Résultats : L'analyse de biofilmsensemencés avec des légionelles post-culture (phase stationnaire), post-*Acanthamoeba castellanii* et post-*Tetrahymena tropicalis* (protozoaire cilié), nous a permis de mettre en évidence que les légionelles se fixent à la surface des biofilms sans y pénétrer. Une observation plus

fine, a mis en évidence que les légionelles issues d'amibes ont tendance à se regrouper ou se multiplier alors que dans les autres conditions, les cellules sont isolées et réparties de manière homogène. De plus, les légionelles issues d'amibes montrent une capacité accrue à synthétiser des exopolysaccharides, à former des biofilms mono-espèces et capable d'induire ce phénotype « biofilm » à des légionelles post-culture via la sécrétion d'une molécule inductrice.

Conclusion : Les légionelles Post-*Acanthamoeba* présentent un phénotype « biofilm » et sécrètent un facteur non identifié capable d'attirer des légionelles issues de culture classique par un phénomène de chimiotactisme.



A. FLIEGER

Legionella phospholipases implicated in virulence.

ANTJE FLIEGER

Robert Koch-Institut, Wernigerode, Germany

Phospholipases are a diverse class of enzymes produced both by eukaryotic hosts as well as pathogens. Major insights into action modes of bacterial phospholipases have been provided during the last years which on the one hand act as potent membrane destructors and on the other hand manipulate and initiate host signalling paths. In *Legionella pneumophila*, phospholipases play a dominant role. Here at least 15 phospholipases A (PLA), three phospholipases C, and one phospholipase D are encoded in the genome and often resemble eukaryotic phospholipases. For example, *L. pneumophila* PLAs divide into three major groups : the GDSL, the patatin-like, and the PlaB-like enzymes. The first two lipase families are also found in higher plants and the second family shows similarities to eukaryotic cytosolic phospholipase A. Therefore, when those enzymes are injected or secreted by the bacterium into the host cell they may mimic eukaryotic phospholipases. The current knowledge on the *L. pneumophila* phospholipases is outlined here with emphasis on their activity, mode of activation and secretion, localisation, and importance for host cell infections.

Un système de sécrétion de Type 1 chez *Legionella pneumophila* impliqué dans la virulence.



C. GILBERT

FABIEN FUCHE¹ ET CHRISTOPHE GILBERT¹

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université de Lyon, Université Lyon 1, ENS de Lyon, 10 rue Dubois. 69622 Villeurbanne cedex, France

Introduction : Le caractère généralement indispensable des systèmes de sécrétion dans la virulence des bactéries pathogènes est aujourd'hui un fait bien établi. *Legionella pneumophila* ne fait pas exception et son Système de Sécrétion de Type IV (SST4) contribue au détournement de nombreux processus cellulaires (via la sécrétion d'effecteurs) afin de se constituer une vacuole de réplication au sein de la cellule hôte (amibe ou macrophage). L'importance d'un Système de Sécrétion de type II (SST2) dans la virulence de *L. pneumophila* a aussi récemment été démontrée (1). Bien que l'existence d'un Système de Sécrétion de type I (SST1) ait été suggérée, à ce jour, aucune étude n'a mis en évidence sa fonctionnalité. Les SST1 sont connus pour permettre la sécrétion de sidérophores, de bactériocines ainsi que de nombreuses toxines, dont la famille des protéines RTX (Repeat-in ToXins).

Objet de l'étude : Une recherche bioinformatique a permis de détecter les gènes *IssB* et *IssD* qui codent pour des protéines présentant respectivement 53 et 47% de similarité avec HlyB et HlyD (constituant avec la protéine TolC un SST1 chez les souches d'*Escherichia coli* pathogènes). Par ailleurs, nous avons antérieurement montré l'importance d'une protéine TolC dans la virulence de *L. pneumophila* (2). Nous avons donc posé l'hypothèse d'un SST1 constitué des 3 protéines LssB-LssD-TolC impliqué dans la sécrétion d'une protéine de la famille RTX : RtxA identifiée dans les génomes de *L. pneumophila*.

Méthodes : Des souches mutantes délétées des gènes *IssB-issD*, *tolC* ou *rtxA* ont été construites chez les souches parentales *L. pneumophila* Lens

et Paris et leur virulence a été étudiée sous différents aspects. Par ailleurs, la reconstruction du SST1 de *L. pneumophila* a été réalisée chez l'hôte hétérologue *E. coli* et sa fonctionnalité a été étudiée.

Résultats : L'étude des souches mutantes délétées a clairement montré l'importance des gènes considérés dans la virulence de *L. pneumophila* vis-à-vis de 2 hôtes amibiens (*Acanthamoeba castellanii* et *Dictyostelium discoideum*) et des macrophages humains. Plus particulièrement, nous avons démontré l'implication des protéines codées par ces gènes lors de la phase précoce de l'infection : l'entrée dans la cellule hôte, les processus ultérieurs tel que l'établissement de la vacuole de réplication du cycle de semblant pas altérés. La reconstruction et l'expression d'un complexe LssB-LssD-TolC chez *E. coli* a permis d'obtenir un SST1 fonctionnel capable d'exporter les protéines hybrides rapporteur-RtxA de *L. pneumophila*.

Conclusion : L'ensemble des résultats obtenus montre clairement qu'un SST1 fonctionnel dont le substrat est la protéine RtxA est présent chez *L. Pneumophila* et qu'il joue un rôle prépondérant lors de la phase initiale de l'infection d'une cellule hôte : l'internalisation des cellules bactériennes.

Rossier, O., Dao, J. and Cianciotto, N.P. (2008) Appl. Environ. Microbiol. 74, 753-761.

Ferhat, M., Atlan, D., Vianney, D., Lazzaroni, J.C., Doublet, P., and Gilbert, C. (2009) PLoS ONE, 4 : e7732.

Impact de la carence en fer sur l'expression des gènes de *L. pneumophila*.



E. PORTIER

**EMILIE PORTIER ¹, CARMEN BUCHRIESER ², TOBIAS SAHR ², NICHOLAS CIANCIOOTTO ³,
JÉRÔME LABANOWSKI ⁴ et YANN HÉCHARD ¹**

¹ Laboratoire d'Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe de Microbiologie de l'Eau, CNRS UMR 7267

² Institut Pasteur, Unité de Biologie des Bactéries Intra-cellulaires, CNRS URA 2171

³ Département de Microbiologie-Immunologie, Université de Médecine, Chicago

⁴ Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers, CNRS UMR 7285

Adresse mail : emilie.portier@univ-poitiers.fr

Le fer est l'élément indispensable à la croissance de nombreuses bactéries dont *L. pneumophila*. La capacité de *L. pneumophila* à infecter son hôte, dépend également de la disponibilité du fer dans le milieu. Cependant l'impact de la disponibilité en fer sur *L. pneumophila* n'est pas encore totalement compris.

L'objectif de cette étude était d'analyser l'impact d'une carence en fer sur l'expression de l'ensemble des gènes de *L. pneumophila* afin de mieux comprendre ensuite le rôle que peut jouer le fer dans l'environnement et notamment dans les biofilms.

Les bactéries ont été cultivées en milieu BYE non supplémenté en fer. En milieu de phase exponentielle, un chélateur de fer, le déferoxamine mésylate, a été ajouté dans le milieu de culture afin de créer une carence. L'expression des gènes au cours du temps a été analysée par microarrays.

Les résultats de l'analyse ont montré que 59 gènes ont été induits par la carence en fer et 142 gènes ont été réprimés après 3h de carence. Parmi les gènes induits, de nombreux gènes sont impliqués dans le métabolisme du fer. Il s'agit des gènes *feoA* et *feoB*, *frgA*, *lbtA*, *lbtB* et *lbtC*. Tous ces gènes présentent en amont de leur séquence une Fur box qui est la cible de la protéine Fur, cette protéine complexée au fer agit comme un inhibiteur de la transcription des gènes. De façon intéressante, un autre gène jamais décrit, mais présentant une Fur Box, *lpp2867*, a été surexprimé.

Ce gène code une protéine dont la fonction est inconnue. Des expériences sont en cours pour comprendre le rôle de ce gène dans le métabolisme du fer. D'autre part, les gènes réprimés sont surtout des gènes impliqués dans des voies de biosynthèse telle que la voie de synthèse des ribosomes, de l'ATP, des peptidoglycane et certains gènes de virulences.

La carence en fer induit donc de nombreuses modifications de l'expression de gènes de *L. pneumophila*, visualisées ici dans leur globalité. Certains gènes avaient déjà été décrits, notamment par le groupe de N. Cianciotto, mais d'autres gènes semblent intéressants et informatifs pour comprendre la réponse globale de la bactérie.

Trois enzymes antagonistes impliquées dans les voies de signalisation à diGMP cyclique favorisent la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* en contribuant à la sécrétion appropriée des effecteurs du système Dot/Icm.



J. ALLOMBERT

J. ALLOMBERT¹, C. GILBERT¹, C. ANDRÉA¹, X. CHARPENTIER², P. DOUBLET¹ and A. VIANNEY¹.

¹ CIRI (INSERM U1111, CNRS UMR5308) Bât. Lwoff, 10 rue Dubois. 69622 Villeurbanne Cedex

² MAP (CNRS UMR5240) Bât. Lwoff, 10 rue Dubois. 69622 Villeurbanne Cedex

Introduction : Le cycle infectieux de *Legionella pneumophila* alterne entre une phase de réplication intracellulaire, au sein d'une vacuole de réplication (LCV : *legionella*-containing vacuole), dans des cellules-hôtes variées (des amibes libres environnementales aux macrophages des alvéoles pulmonaires), et une phase de transmission correspondant à son état virulent.

Le diGMP cyclique (diGMPc) est un second messager dont le rôle dans les changements d'états a été démontré chez différentes bactéries. Chez *L. pneumophila*, la plupart des gènes codant des protéines supposées métaboliser le diGMPc (protéines à domaines GGDEF et/ou EAL) sont surexprimés lors de la phase de transmission, suggérant que l'expression de certains traits de virulence serait contrôlée par des voies de signalisation impliquant le diGMPc.

Objet de l'étude : Nous avons identifié les enzymes du métabolisme du diGMPc impliquées dans le contrôle de la virulence de la souche Lens de *L. pneumophila*, puis caractérisé les étapes du cycle infectieux qui dépendent des voies de signalisation associées.

Méthodes : Délétions systématiques des gènes codant les enzymes potentielles du métabolisme du diGMPc et identification de celles conduisant à une multiplication déficiente dans différentes cellules hôtes. Caractérisation de l'étape du cycle infectieux touchée, notamment par mesure de l'échappement à la voie endosomale, suivi du recrutement du réticulum endoplasmique sur la LCV et suivi de l'efficacité de sécrétion d'effecteurs du système de sécrétion de type IV Dot/Icm connus pour leur rôle dans la

biogénèse de la LCV.

Résultats : Parmi les 22 protéines de la souche Lens potentiellement capables de synthétiser ou de dégrader le diGMPc, 3 sont requises pour une multiplication intracellulaire efficace dans les amibes et dans les macrophages. En effet les délétions des gènes correspondants, de même que les mutations introduites dans les sites catalytiques des domaines GGDEF/EAL, conduisent à un retard dans la multiplication intracellulaire par rapport à la souche parentale. Ces 3 protéines, soit la diguanylate cyclase Cdg1, l'enzyme bi-fonctionnelle (diguanylate cyclase/phosphodiesterase) Cdg2, et la phosphodiesterase Pde1, sont nécessaires à la survie intracellulaire de *L. pneumophila*. L'une d'elles, Pde1, est également requise pour un recrutement optimal du réticulum endoplasmique sur la LCV. Enfin, nous avons mis en évidence que l'absence des ces protéines modifie de façon spécifique le profil de sécrétion d'un panel de onze effecteurs du système Dot/Icm, du fait notamment de la modification de leur cinétique de sécrétion.

Conclusion : Nos résultats démontrent que les protéines Cdg1, Cdg2 et Pde1 sont impliquées dans des voies de signalisation à diGMPc qui contribuent à orchestrer la sécrétion des effecteurs du système Dot/Icm, permettant ainsi une biogénèse de la LCV et un échappement à la voie de dégradation endosomale efficaces.

La protéine kinase LegK2 de *L. pneumophila* cible le complexe ARP2/3 de l'hôte pour inhiber la polymérisation d'actine sur la LCV et permettre l'échappement des bactéries à la voie endocytique.



C. MICHARD

C. MICHARD, N. BAILO, E. CHADEAU, C. GILBERT ET P. DOUBLET

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université de Lyon, Université Lyon 1, ENS de Lyon, Lyon, France

Introduction : *Legionella pneumophila* est une bactérie opportuniste qui émerge de l'environnement après multiplication dans des amibes et peut infecter accidentellement les macrophages alvéolaires humains, provoquant une pneumonie sévère, la légionellose. La capacité de *L. pneumophila* à échapper à la dégradation endocytique par ses cellules hôtes, amibes ou macrophages, est strictement dépendante du système de sécrétion de type 4 Dot/Icm, qui sécrète un large répertoire de protéines bactériennes dans le cytosol de l'hôte. Identifier la contribution individuelle de chaque effecteur du système Dot/Icm, i.e. de chaque protéine bactérienne sécrétée, dans le cycle infectieux de *L. pneumophila* reste un enjeu majeur pour comprendre les bases moléculaires de la virulence des légionelles.

Objet de l'étude : Nous avons abordé cette question en focalisant notre étude sur la protéine kinase *LegK2*, que nous avons précédemment montrée jouer un rôle clé dans la virulence de *L. pneumophila*. En particulier, nous avons observé que l'inactivation du gène *legK2* résultait en des défauts marqués de l'évasion des bactéries à la voie endocytique et de multiplication intracellulaire¹.

Méthodes : Un crible double hybride dans la levure et des essais de phosphorylation *in vitro* et *in vivo* ont été mis en place pour identifier la cible cellulaire de *LegK2*. L'effet de l'inactivation du gène *legK2* et de l'inhibition chimique de l'activité de sa cible cellulaire sur le cycle infectieux de *L. pneumophila* a été suivi par microscopie confocale.

Résultats : Des expériences complémentaires de double hybride et de phosphorylation ont permis de montrer que *LegK2* non seulement interagissait mais aussi phosphorylait les sous-unités ArpC1b et Arp3 du complexe nucléateur d'actine Arp2/3. La protéine kinase est adressée à la surface du phagosome après sa translocation dans le cytosol de l'hôte et l'interaction *LegK2*-Arp2/3 inhibe la nucléation d'actine sur le phagosome. L'inhibition de la polymérisation d'actine à la surface de la vacuole diminue le trafic des endosomes tardifs et/ou des lysosomes vers le phagosome et favorise l'évasion du phagosome à la voie endocytique.

Conclusion : L'interaction *LegK2*-Arp2/3 met en évidence un mécanisme original de virulence bactérienne dans lequel le remodelage local du cytosquelette d'actine de la cellule hôte permet à la bactérie de manipuler le trafic vésiculaire pour échapper aux défenses de l'hôte.



Posters

Légionellose : état des lieux de la déclaration obligatoire en Wallonie (Belgique), en 2012.

P1

S. JACQUINET¹, O. DENIS² ET P. VALENTE SOARES³.

¹ Cellule d'inspection d'hygiène, Fédération Wallonie Bruxelles.

² Centre National de Référence des Légionelles, hôpital Erasme Bruxelles, Université Libre de Bruxelles.

³ Ecole de Santé Publique, Université Libre de Bruxelles.

Introduction : Malgré une mortalité et morbidité non négligeables, la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire auprès des autorités sanitaires qui est fréquemment sous rapportée.

Objectifs : Le calcul de l'exhaustivité de la déclaration obligatoire de la légionellose et l'estimation de son incidence en Wallonie pour l'année 2012.

Méthodologie : Cette étude descriptive transversale rétrospective s'est basée sur une méthode capture-recapture à 2 sources : la notification des cas au niveau du service de surveillance des maladies infectieuses de la Fédération Wallonie Bruxelles et les hôpitaux situés en région wallonne. Les cas inclus étaient les cas de légionellose confirmés ou probables dont la date des premiers symptômes était comprise entre le 1^{er} janvier 2012 et le 31 décembre 2012 et dont le domicile se situait en Wallonie. La définition de cas utilisée fut celle du « European Centre for Disease Prevention and Control » (ECDC). Une estimation du nombre total de cas de légionellose a été réalisée en utilisant les estimateurs de Chapman et Seber pour effectifs faibles. Ensuite, l'incidence réelle de légionellose en Wallonie ainsi que l'exhaustivité de la déclaration ont pu être calculées.

Résultats : Le nombre total de cas estimés de légionellose pour l'année 2012 est de 45 (IC 95% : 42-48) et le taux d'exhaustivité de la déclaration obligatoire est de 65% (IC 95% : 60-69%). L'incidence estimée de la légionellose en région wallonne est de 1,27/100.000 habitants.

Conclusion : Cette étude montre que les médecins devraient être mieux sensibilisés à la déclaration de la légionellose afin d'augmenter le nombre de déclarations.

L'ATP-métrie : outil d'aide à la décision dans l'investigation autour d'un cas de légionellose.

P2

L. NEYRAT¹, L. BELOTTI², C. HERNANDEZ¹, J. FOEGLE¹, S. DEBOSCKER¹, C. BOULAY³, M. RAYMOND⁴ et T. LAVIGNE¹

¹ Equipe Opérationnelle d'Hygiène, CHU Strasbourg

² Laboratoire d'Hygiène Hospitalière, CHU Strasbourg

³ Direction des Infrastructures et des Travaux, CHU Strasbourg

⁴ Société AQUA-TOOLS, Aubergenville, France

Introduction : Un cas de légionellose est diagnostiqué dans un EHPAD rattaché au CHU de Strasbourg. L'enquête réalisée n'a pas permis d'identifier de réels facteurs d'exposition, l'hypothèse d'une contamination à partir d'un robinet de lavabo est évoquée. La mise en sécurité de tous les points d'eau, y compris ceux peu générateurs d'aérosol, a été requise. Cette recommandation est difficile à mettre en place vu le nombre de robinets à changer et à équiper de filtre. Il est nécessaire de cibler rapidement les points à sécuriser en priorité, afin d'éviter la survenue d'un autre cas. Les résultats de prélèvements bactériologiques « classiques » à la recherche de légionelles ne sont pas rendus avant une semaine.

Objet de l'étude : Evaluer lors de la gestion d'une alerte « légionellose » l'apport de l'utilisation d'une technique de détection indirecte rapide (ATP-métrie de seconde génération) permettant de cartographier l'étendue possible de la contamination et de mettre en place dans les plus brefs délais les mesures correctives adéquates.

Méthodes : En complément des prélèvements habituels, une prestation de mesure de la biomasse par ATP-métrie (kit QGA™, Aqua-tools®, Aubergenville, France) a été demandée par le CHU et mise en œuvre par Aqua-tools®. La technique donne des résultats en temps réel (3 min par échantillon). Une évaluation de l'installation est réalisée en même temps.

Résultats : Lors de la première campagne de mesures, l'ATP-métrie a mis en évidence un réseau d'eau froide sain et un réseau d'eau chaude globalement perturbé, sans pouvoir déceler une colonne d'eau particulière

responsable de cette contamination. L'inspection menée sur site lors des prélèvements, a révélé que le réseau d'eau chaude sanitaire de notre bâtiment (A) et celui d'un site B (hors CHU) étaient reliés. Le chantier du site B (hors CHU) comportait deux larges boucles d'eau mitigée. La flore totale mesurée par ATP-métrie, était deux fois plus élevée dans l'eau prélevée sur le retour d'eau chaude que sur le départ d'eau chaude vers le site B.

En plus de l'intensification des purges sur l'ensemble du bâtiment (A), les réseaux et productions d'eau chaude des deux sites ont été séparés rapidement. Suite à ces mesures drastiques, la deuxième campagne de mesures de la biomasse par ATP-métrie corrobore avec les analyses microbiologiques « classiques » : le risque de prolifération de légionelles est considéré comme maîtrisé. Une très nette amélioration est observée sur l'ensemble des points prélevés.

Conclusion : L'ATP-métrie (dosage et visite) s'est révélée être une méthode coût-efficace pour la gestion de l'alerte face à un cas de légionellose d'origine nosocomiale. Cet outil de diagnostic en temps réel a permis une orientation rapide sur l'origine de la contamination. De façon générale, l'ATP-métrie semble être un bon outil pour déterminer, sur site, des niveaux de contamination différents au sein d'un réseau et pour en identifier les points défavorisés.

Traitement anti-bactérien des eaux de refroidissement sans chimie et suivi de l'efficacité par ATP-métrie.

P3

F. PERRIN¹, S. POTTIER¹

¹ ARIONIC, Lyon 69

Introduction : Le traitement des eaux de refroidissement est une problématique complexe car l'industriel doit garantir l'absence de *Legionella* tout en devant répondre à des critères de plus en plus stricts sur les rejets de produits chimiques. Une nouvelle génération de traitement sans chimie est désormais disponible sur le marché, basée à la fois sur l'éradication des supports (tartre, biofilm, corrosion, ...) mais également sur un abattement bactérien permanent en circuit.

Le contrôle de l'efficacité peut se faire in situ par ATP-métrie, donnant ainsi une bonne vision de la qualité microbiologique de l'eau.

Objet de l'étude : L'étude fait une synthèse de quelques études de cas, dans laquelle nous détaillons les phénomènes observés et comparons les typologies de circuits et de traitement.

Méthodes : La méthode de traitement physique de l'eau par polarisation magnétique sera abordée dans le détail, les résultats d'analyse étant basés sur des analyses réglementaires par culture, soit par ATP-métrie.

Résultats : Nous mesurons une baisse significative de la flore totale dans la plupart des circuits de refroidissement étudiés, phénomène observé ans les premières semaines de traitement, par décrochage combiné de tartre et de biofilm. Dans tous les cas, les valeurs mesurées par ATP-métrie sont conformes aux seuils de suivi communément mis en œuvre dans l'industrie.

Conclusion : La combinaison du traitement physique de l'eau de refroidissement et du suivi en temps réel par ATP-métrie offre une bonne perspective d'évolution aux industriels souhaitant anticiper les futures contraintes environnementales, tout en assurant un contrôle de l'écosystème de leurs circuits. Le traitement physique joue le rôle de traitement permanent, les produits chimiques ne sont nécessaires que dans le cadre d'opérations curatives exceptionnelles.

General rules for optimizing *Legionellae* viable cell detection by PCR.

P4

FITTIPALDI MARIANA¹, AGUSTÍ GEMMA², MANERO ALBERT³ AND CODONY FRANCESC^{1,2}

¹ MSM Lab . Universitat Politècnica de Catalunya, Rambla de Sant Nebridi 22. 08222. Terrassa, Spain

² GenUL, Rambla de Sant Nebridi 22. 08222. Terrassa, Spain

³ Aigües de Terrassa. Laboratori . c / Nord 88 - 08221 Terrassa, Spain

Fast detection of viable organisms levels is key for most microbiological applications, especially when analytical results are related to health risk assessment. One example where the former is difficult to accomplish is *Legionellae* detection by culture, which needs at least 5 days to obtain a first consistent result. The current standard alternative is DNA detection by PCR. Nevertheless total DNA is detected when this approach is used. Therefore, in some cases, there does not exist a clear correlation between cells levels and sanitary risk because DNA from dead cells is also detected.

Nowadays, in order to avoid this drawback, viability PCR (vPCR) is emerging as a new analytical improvement. By the means of a simple sample pre-treatment using specific intercalating reagents is possible to neutralize dead cells DNA (cells with compromised cell membrane). As a result, only DNA from live cells will be detected by PCR.

The principle of vPCR is based on the use of some photo-reactive azide forms of phenanthridinium, such as PMA and EMA. Theoretically, these DNA intercalating dyes are unable to diffuse through intact cell membranes. In dead cells, these reagents are able to neutralize its DNA due to these cells, or have damaged cell membranes or are unable to exclude these dyes. By using a light treatment, the reagent becomes irreversibly bounded to dead cells DNA. Consequently, this DNA is not available to be amplified by DNA polymerase. Thus, it will not be detected by PCR.

The theory is very simple, and currently there exist several published procedures based on this approach for the detection of viruses and bacteria up to fungi and parasites. However, a direct adaptation of a pre-existing qPCR procedure is not always sufficient to obtain a good discrimination range between dead and live cells. Hence, optimization of the vPCR techniques' parameters is required.

There exist different critical points that need to be considered in order to increase yield of dead cell DNA neutralization. The appropriate selection of the dye and its concentration, reaction buffer, incubation temperature and time, photo-activation device and time, and PCR amplicon size, permits to easily obtain discrimination ratios of 1:10000 (live : dead cells).

The aim of this communication is reviewed and highlighted the different critical steps and optimization strategies for vPCR, including some examples for *Legionellae* detection.

As example, using a commercial qPCR kit and introducing few changes in sample pre-treatment (increase of reagent concentration, incubation time and temperature, has been possible to obtain at least a reduction signal up to 4,2 log, increasing the procedure performance in 1,5 log in reference with the first approach.

Transformation naturelle de *Legionella pneumophila* et rôle dans le processus infectieux.

P5

P-A. JUAN, A. BOUGHAMMOURA ET X. CHARPENTIER

Equipe « Signalisation et génétique de la compétence des bactéries pathogènes », UMR 5240 « Microbiologie, Adaptation, Pathogénie », Bâtiment Lwoff 3^e étage, 10 rue Raphaël Dubois, Villeurbanne, France

Introduction : La compétence pour la transformation bactérienne est un état physiologique génétiquement programmé qui permet aux bactéries d'acquérir et d'intégrer de l'ADN exogène libre. *Legionella pneumophila* est un pathogène intracellulaire capable de survivre et de se répliquer dans de nombreux phagocytes, parmi lesquels les amibes et les macrophages pulmonaires humains. Le génome de *L. pneumophila* montre un très grand nombre de gènes eucaryotes ou d'origine eucaryote, témoins de transferts horizontaux de gènes passés.

Objectif : L'objectif de ce travail était (1) d'identifier les gènes impliqués dans la transformation naturelle de *L. pneumophila* et (2) de déterminer le rôle de ces gènes dans l'interaction et l'adaptation de *L. pneumophila* avec ses hôtes naturels (amibes) et accidentels (macrophages).

Méthodes : Une analyse transcriptomique par RNA-seq a été réalisée sur un mutant hypercompétent afin d'identifier les gènes surexprimés et potentiellement impliqués dans la transformation naturelle. Nous avons identifié vingt gènes candidats et réalisé les mutants correspondants pour déterminer leur implication dans la transformation naturelle. Enfin, nous avons observé l'impact de ces mutations sur la capacité de répllication intracellulaire de la bactérie dans différents hôtes.

Résultats : Sur la vingtaine de gènes présentant un niveau de transcription accru dans le mutant hypercompétent, huit sont vraisemblablement impliqués dans la transformation naturelle de *L. pneumophila*. Les huit mutants montrent des

capacités de répllication intracellulaire variable et significativement altérées. Cependant, il ne semble pas exister de corrélation entre la perte de la transformation naturelle et une infectivité altérée.

Conclusion : Nous avons identifié des gènes impliqués dans la transformation naturelle de *L. pneumophila*, ce qui permettra de mieux appréhender le fonctionnement de ce mécanisme chez cette espèce bactérienne. D'autre part, les résultats préliminaires obtenus à ce jour en modèle d'infection suggèrent que certains composants de la machinerie de transformation jouent également un rôle dans le processus infectieux de *L. pneumophila*.

Les alertes liées aux légionelles en Rhône-Alpes

Modalités d'organisation et de gestion.

P6

A. PLANEL¹ et J.M. YVON²

¹ Agence Régionale de Santé Rhône-Alpes

² Cellule de l'Institut de Veille Sanitaire en Région Rhône-Alpes

La région Rhône-Alpes est une région comportant 8 départements totalisant 6,3 millions d'habitants, au 2^{ème} rang des régions les plus peuplées après l'Ile-de-France. Elle est aussi la deuxième région touristique Française. La région regroupe ainsi près de 10 % de la population française métropolitaine mais totalise 17 % des cas de légionellose déclarés.

Les signaux sont reçus et traités par l'ARS à travers deux entrées différentes : l'entrée médicale (217 cas en 2012) et environnementale (87 signaux en 2012) :

- Les signaux à entrée médicale sont constitués des Déclarations Obligatoires des cas de légionellose que ce soit des cas communautaires ou des cas nosocomiaux ;
- Les signaux à entrée environnementale sont constitués d'une part, par les dépassements de seuils réglementaires suite à des analyses de Legionella dans les Tour Aéro-Réfrigérante (TAR) ou dans un réseau d'eau chaude d'un Etablissement Recevant du Public (ERP) et d'autre part, par des signalements du réseau européen ELDSN et ou de départements d'autres régions de cas de légionellose ayant séjourné dans la région Rhône-Alpes.

La réception de ces signaux peut parfois aboutir à l'identification d'un cas groupé.

Plusieurs services de l'Agence Régionale de Santé (ARS) interviennent pour répondre dans leur champ de compétence aux signalements de cas de légionellose ou d'exposition à des légionelles :

- La cellule régionale de veille et de gestion des alertes sanitaires (CRVGS), composés de médecins, d'infirmières et d'assistantes, est

organisée autour de 3 secteurs infra-régionaux, elle est chargée de la réception des Déclarations Obligatoires (DO) et des enquêtes auprès des patients (recherche des sources d'exposition) ;

- Les services **Environnement et Santé**, composés de techniciens et d'ingénieurs, sont présents dans chacun des 8 départements de la région, ils sont chargés des enquêtes environnementales autour des cas ou lors de situations d'exposition à la légionelle ;
- La cellule de l'InVS en région (**Cire**) composée d'épidémiologistes, intervient en appui des services de l'ARS notamment lors de cas groupés pour l'analyse épidémiologique.

Les modalités d'investigation et de gestion des différentes situations sont définies à partir des instructions nationales et des travaux de groupes régionaux qui permettent l'échange sur les pratiques et la construction d'outils communs d'investigation et d'intervention.

Lors de l'identification de cas groupés, une organisation permettant des échanges réguliers et la prise de décision concertée entre les acteurs de l'ARS et la CIRE est en place. Des actions telles que la recherche active de cas, la réalisation de prélèvements cliniques et environnementaux, l'identification des souches par le CNR et, des contrôles sur place en particulier lorsque des ERP sont identifiés, sont mis en œuvre.

Détection rapide de la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides par PCR en temps réel utilisant des sondes “Sloppy molecular beacons”.

P7

Nathalie JACOTIN, Ghislaine DESCOURS, Françoise FOREY, Joëlle CHASTANG, Jérôme ETIENNE, Gérard LINA, Sophie JARRAUD and Christophe GINEVRA

Centre National de Référence des légionelles, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Objectif : *In vitro*, *Legionella pneumophila* présente un fort potentiel d'acquisition de résistance aux macrolides. Lors de travaux antérieurs nous avons identifié les mutations dans le gène codant pour l'ARN ribosomal 23S associées à la résistance aux macrolides. Notre objectif a été de développer un outil de détection de ces mutations simple, rapide et spécifique, applicable sur souche et prélèvement pulmonaire.

Méthodes : Cette méthode consiste en une PCR en temps réel asymétrique amplifiant le gène codant pour l'ARN ribosomal 23S de *L. pneumophila* suivie d'une courbe de fusion, la détection s'effectue par l'utilisation de 2 sondes « Sloppy molecular beacons » (SMB). Les sondes sont complémentaires de la séquence cible non mutée donc sensible aux macrolides. Des mutations dans cette séquence entraînent un décalage du T_m .

Résultats : La méthode a été validée sur l'ADN extrait de souches contenant toutes les mutations connues dans le gène codant pour l'ARNr 23S entraînant une résistance aux macrolides. Nous avons observé un décalage de T_m d'au moins 3°C pour toutes les mutations. La spécificité de la méthode a été testée sur un panel de 125 prélèvements cliniques contenant les espèces les plus fréquemment isolées lors d'infections pulmonaires. La sensibilité a été déterminée par l'analyse de dilutions de l'ADN étalon

de *L. pneumophila* et d'extraits d'ADN de souches contenant des mutations dans le gène codant pour l'ARN ribosomal 23S. La spécificité de la PCR est de 95,2%. La limite de détection de la méthode avec l'ADN étalon est de 3 UG/ μ L et de 0.2 pg/ μ L avec l'ADN extrait de mutant pour chaque PCR. Une étude préliminaire a été effectuée sur 446 ADN extraits de souches *L. pneumophila* d'origine clinique et environnementale et 34 ADN extraits de prélèvements cliniques positifs en PCR *L. pneumophila*. Aucun décalage de T_m n'a été observé. La PCR a également été testée sur 74 souches de référence (15 sérogroupes de *L. pneumophila* et 59 *Legionella spp.*). La méthode identifie les 15 sérogroupes de *L. pneumophila* et 41/59 de *Legionella spp* comme sensibles aux macrolides.

Conclusion : L'utilisation de sondes SMB avec analyse du T_m apparaît être un outils valide, applicable sur souche et prélèvements, pour détecter rapidement la résistance de *L. pneumophila* aux macrolides.

AFM, CLSM and EIS characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila* in environmental samples.

P8

M. SOUIRI¹, D. SBOUI¹, N. BIEL¹, L. MHAMDI¹, T. EPALLE²; R. MZOUGHI³, S. RIFFARD² and A. OTHMANE¹

S. Riffard and A. Othmane contributed equally to the work

¹ Laboratory advanced materials and interfaces, Faculty of Medicine– 5019 Monastir, Tunisia

² Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), EA 3064, SFR 143, University of Lyon, F42023, France

³ Regional Laboratory of Hygiene, University Hospital Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisia

Introduction : The microscopic surface molecular structures and properties of an anti-*Legionella pneumophila* antibody layer on an indium-tin oxide (ITO) electrode surface were studied to elaborate an electrochemical immunosensor for *Legionella pneumophila* detection.

Methods : A monoclonal anti-*Legionella pneumophila* antibody (Mab) has been immobilized onto an ITO electrode by Self Assembled Monolayer (SAMs) method via direct chemical bonds between epoxysilane containing SAMs and antibodies amino-group. The functionalization of the immunosensor and its efficiency for bacterial capture were characterized by atomic force microscopy (AFM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), wettability by measuring contact angle in probe water, cyclic voltammetry and electrochemical impedance variation in the presence of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ as a redox probe.

Results : AFM images of the SAM evidenced the dense and homogeneous morphology of the epoxysilane monolayer on the ITO surface. The uniformity of the epoxysilane SAM allowed antibodies to attach to the epoxy surface groups of the silanes. The effects of epoxysilane monolayer and the antibody layer on the electrochemical properties of the electrode was demonstrated, those layers acting as barriers for the electron transfer between the electrode surface and the redox species in the solution (significant increases

in the electron transfer resistance compared to all the electric elements). Specific binding of *L. pneumophila* sgp 1 cells was evidenced by CLSM imaging and impedance spectroscopy. A linear relationship between the charge transfer resistance (R_{ct}) increases together with *Legionella pneumophila* concentrations was observed.

Conclusion : A detection limit of 5×10^1 CFU.mL⁻¹ was achieved during preliminary tests on artificial samples. The present study has demonstrated the successful deposition of an anti-*L. pneumophila* antibodies monolayer on an indium-tin oxide surface, opening its subsequent use as immuno-captor for the specific detection of *L. pneumophila* in environmental samples provided that such a detection limit be confirmed in real environmental samples.

Intérêt respectif de différentes méthodes de détection de *Legionella pneumophila* séro groupe 1.

P9

O. CHALLEMEL¹, F. ENKIRI¹, M. ADNANE¹, A. BOURNONVILLE¹, I. LEGAIGNEUR¹, E. LE PETIT¹, S. DUBROU¹ ET D. CARLIER¹

¹ Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris 11 rue George Eastman 75013 Paris

En France, l'espèce *L. pneumophila* est responsable de plus de 90% des cas de légionellose, et le séro groupe 1 représente la grande majorité des cas déclarés. L'arrêté du 1^{er} février 2010 impose aux gestionnaires des établissements recevant du public une surveillance annuelle des installations d'eau chaude sanitaire (ECS) par rapport au risque lié aux légionelles. Les dénombrements en *Legionella pneumophila* doivent être inférieurs à 1 000 unités formant colonie (UFC) par litre au niveau des points d'usage à risque. La technique réglementaire décrite dans la norme française T90-431 impose l'identification de *L. pneumophila* mais n'exige pas la recherche des séro groupes.

Une centaine d'échantillons d'eaux chaudes sanitaires ont été soumis aux différentes techniques, testées en parallèle. La première méthodologie, basée sur la culture, correspond à la méthode de référence (norme NF T90-431). Le concentrat est obtenu par filtration sur membrane avec remise en suspension dans 5 mL et traitement aux ultrasons. L'espèce *L. pneumophila* est identifiée après repiquage de 1 à 5 colonies et le séro groupe 1 mis en évidence par immunofluorescence. La deuxième technique utilise également la culture : l'échantillon est concentré par filtration, remis en suspension dans 2 mL et soumis à agitation pendant 20 secondes. La troisième méthode par PCR en temps réel suit la norme NF T90-471 pour l'espèce *L. pneumophila*. Cette technique ne permet pas d'identifier le séro groupe 1. Une quatrième méthode a donc été mise en place pour la quantification des *L. pneumophila* séro groupe 1. Elle fait appel à un protocole décrit par N. Merault

et col. (2011), après adaptation sur le thermocycleur LC 480.

Des informations équivalentes ont été obtenues par culture et par PCR pour la recherche de l'espèce *L. pneumophila* et du séro groupe 1. Ainsi, un résultat PCR négatif donne systématiquement un résultat négatif par culture. De même, les échantillons positifs en culture le sont également en PCR. La spécificité de la sonde et des amorces utilisées dans la PCR pour la détection des *L. pneumophila* séro groupe 1 est bien vérifiée pour l'ensemble des échantillons analysés.

La deuxième méthode par culture offre un meilleur rendement (augmentation du nombre de prélèvements positifs) et une plus grande sensibilité (diminution de la limite de quantification à 100 UFC/L) que la méthode NF T90-431 et permet d'obtenir une meilleure concordance avec les techniques par PCR. Les techniques de PCR employées montrent un inconvénient, leur seuil de quantification à 800 UG/L, qui limite la quantification des légionelles pour les valeurs faibles.

Enfin, dans certains cas, le rapport observé entre le séro groupe 1 et l'espèce *L. pneumophila* est plus élevé par culture que par PCR. Ceci pourrait être dû aux réactions croisés qui peuvent se produire par immunofluorescence.

Ces premières constatations demandent à être confirmées sur un plus grand nombre d'échantillons d'eau positifs en *L. pneumophila* séro groupe 1.

Evaluation du test immunochromatographique fluorescent Sofia Legionella FIA pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*.

P10

ANNE-MARIE FREYDIERE, GHISLAINE DESCOURS, FRANÇOIS VANDENESCH, GÉRARD LINA ET SOPHIE JARRAUD

¹Centre National de Référence des Légionelles, Hospices Civils de Lyon - Centre de Biologie et de Pathologie Est - Laboratoire de Bactériologie - 59 boulevard Pinel - 69677 Bron, France.

Objectif : Evaluation du réactif immunochromatographique Sofia *Legionella* FIA (QUIDEL) pour la détection des antigènes urinaires *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 en comparaison avec le test BINAX NOW *Legionella* (ALERE).

Matériels et Méthodes : Les performances du test ont été évaluées (i) sur 150 urines reçues pour recherche d'antigène urinaire *Legionella* et testées négatives avec le réactif NOW (ii) sur 49 urines positives avec le réactif NOW *Legionella* et correspondant à des patients atteints de légionellose conservées à -20°C. Les urines étaient testées non-concentrées avec le test Sofia et les résultats étaient comparés à ceux obtenus simultanément avec le test NOW sur urines concentrées par centrifugation/ultrafiltration (membrane Amicon Ultra-4; Millipore). Toutes les urines positives ont été vérifiées après chauffage 5 min à 100°C et centrifugation à 1000 rpm. Les urines donnant un résultat discordant entre les 2 méthodes étaient contrôlées par la méthode ELISA Binax (ALERE) sur urines chauffées.

Résultats obtenus : Sur les 199 urines testées, les tests Sofia et NOW ont donné respectivement 146 et 150 résultats négatifs et 53 et 49 résultats positifs (Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison des résultats du test Sofia effectué sur urines non concentrées au test NOW effectué sur urines concentrées.

		Binax NOW <i>Legionella</i> Urines concentrées		Total
Sofia <i>Legionella</i> Fia Urines non concentrées		-	+	
	-	146	0	146
	+	4 ^a	49	53
Total		150	49	199

^a Les 4 urines positives avec le test Sofia et négatives avec le test NOW ont toutes donné un résultat négatif après chauffage à 100°C pendant 5 min. Aucune ne correspondait à des patients ayant des signes cliniques en faveur d'une pneumonie à *Legionella* et 3 de ces 4 urines qui ont pu être contrôlées avec le test ELISA Binax ont donné un résultat négatif.

Conclusion : Le test Sofia effectué sur urines non concentrées montre une sensibilité et une spécificité de 100% et 97,3% respectivement comparées à 100% et 100% pour le test NOW effectué sur urines concentrées. La spécificité du test Sofia augmente à 100% si le chauffage des urines est effectué. Le test Sofia est un test fluorescent à lecture automatisée ce qui annihile toute subjectivité. De plus, il offre une traçabilité des résultats en accord avec les exigences de l'accréditation.

Investigation d'une suspicion de cas groupés de légionellose, Aurillac (Cantal), Décembre 2012.

P11

E. VAISSIÈRE¹, M. LACASSAGNE², S. MAGNE² ET C. CAMPESE¹

¹Cellule de l'Institut de veille sanitaire en région Auvergne, Clermont-Ferrand, France² Agence régionale de santé, Délégation territoriale du Cantal, Aurillac, France

³Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France

Introduction : Fin décembre 2012, trois cas de légionellose, âgés entre 62 et 85 ans, sont diagnostiqués au Centre hospitalier d'Aurillac. Leurs dates de début des signes étant très proches, l'existence d'un cas groupés est suspectée. Pour deux des patients, la souche Pulsotype F, ST : 259, sous-groupe Philadelphia est isolée. Or, depuis 2008, le Centre national de référence (CNR) a reçu six autres souches présentant ce même profil en provenance du laboratoire du CH d'Aurillac.

Objet de l'étude : L'objectif de cette étude était de décrire les cas de légionellose signalés à Aurillac depuis 2008 afin d'identifier une source de contamination commune.

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 et reportés sur une carte afin d'identifier une zone de fréquentation commune. L'enquête environnementale a consisté à rassembler les résultats d'autocontrôle des tours aéro-réfrigérantes (TAR) situées dans le secteur défini et à élargir les recherches à d'autres sources d'exposition possibles. 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 : Au total, 9 cas répondant à la définition de cas ont été inclus dans l'étude : 2012 (n=4), 2010

(n=3), 2009 (n=1), 2008 (n=1). Pour 6 d'entre eux une souche était disponible, appartenant au Pulsotype F, ST 259, sous-groupe Philadelphia (les deux autres cas signalés par le CNR ont été exclus car sans notion de déplacement à Aurillac). L'âge médian des cas était de 60 ans (min : 42 ans, max : 85 ans). Le sex ratio (H/F) était égal à 2. Près de 78% des cas présentaient au moins un facteur de risque connu. L'évolution a été favorable, excepté pour un homme âgé de 85 ans décédé en janvier 2013, soit une létalité de 11%. Même si toutes ces personnes ne sont pas domiciliées à Aurillac, elles ont en commun un ou plusieurs déplacements dans cette agglomération. L'hypothèse d'une contamination par l'eau chaude sanitaire a été écartée pour 8 des 9 cas (1 refus de visite). Les résultats de l'auto-surveillance des TAR n'ont pas révélé d'anomalie au moment des périodes supposées de contamination des cas. Des prélèvements ont été effectués au niveau du brumisateur d'une grande surface fréquentée par deux des cas, ainsi que sur 3 des 8 laveurs d'air d'une entreprise de plasturgie. Les prélèvements réalisés étaient conformes aux seuils réglementaires.

Conclusion : Les enquêtes environnementales menées n'ont pas permis de mettre en évidence la source de contamination à Aurillac. La souche identifiée chez les patients d'Aurillac présente un profil déjà répertorié par le CNR, en nette progression depuis 2010. Trente-sept isolats similaires ont déjà été caractérisés en provenance de 11 régions différentes, dont la plupart (11/37, soit 29,7%) en Auvergne. Un travail a été entrepris pour documenter l'ensemble des cas recensés au niveau national et préciser leurs expositions.

Investigation de cas groupés de légionellose en région Centre : intérêt d'un outil cartographique dans l'aide à la gestion des cas de légionellose.

P12

L MENUDIER¹, S LEPELTIER², E KOUVTANOVITCH¹, J CHARBONNEL², O FORET² et D JEANNEL¹

¹Cellule de l'Institut de veille sanitaire en Région (Cire) Centre

²Agence régionale de santé du Centre

Contexte : En 2012, 46 cas de légionellose ont été déclarés en région Centre soit un taux d'incidence de 1,8/100 000 habitants. Ce taux connaît une augmentation annuelle de 10% depuis 2008 en région Centre. En effet, la tendance à la baisse rapportée depuis 2005 en France n'est pas observée en région Centre. Cette augmentation est marquée par la survenue d'épisodes de cas groupés. Pour faciliter les investigations, la Cire et l'ARS du Centre ont développé une application cartographique (dénommée *Légio Centre*) dédiée à l'aide à l'investigation et la gestion des cas de légionellose.

Dans ce contexte, l'ARS du Centre a réceptionné 6 DO de légionellose dans l'agglomération de Tours entre le 17 juin et le 3 juillet 2013.

Objectif : Les investigations menées par la Cire et l'ARS avaient pour objectif de décrire l'épisode afin d'identifier la source de contamination.

Méthodes : Une recherche active de cas a été effectuée auprès du CHU de Tours. Les prélèvements broncho-pulmonaires disponibles ont été adressés au CNR pour culture, caractérisation des souches et comparaison entre elles. L'enquête environnementale a permis de vérifier les taux de légionelles sur les tours aéro-réfrigérante (TAR). L'application *Légio Centre* a été utilisée pour investiguer les cas de légionellose selon leurs domiciliations, leurs déplacements et la présence de TAR.

Résultats : Six cas de légionellose à *Legionella pneumophila* séro groupe 1 ont été diagnostiqués par antigénurie positive. Il s'agit de 6 hommes d'un âge médian de 73 ans (58-86 ans). Les dates de début des signes se répartissaient entre le 12 et le 28 juin

2013. Cinq patients avaient des facteurs de risque : tabagisme (3), diabète (2) et cancer (1). Ils ont tous été hospitalisés et sont tous guéris. Tous étaient domiciliés dans l'agglomération de Tours ou l'avaient fréquentée. Un cas était intervenu sur le réseau d'eau d'une clinique ; les résultats des autocontrôles ne montraient pas de contamination en légionelles dans l'établissement. Un autre cas a séjourné dans un établissement de soins ; les contrôles dans l'établissement n'ont pas montré de contamination en légionelles sur les 10 points prélevés représentatifs de la distribution d'eau chaude sanitaire. Les prélèvements étaient négatifs sur la douche de la chambre dans laquelle le patient avait été hospitalisé. Les analyses sur les retours de boucle et fonds de ballons étaient également négatives. Les résultats des autocontrôles des installations à risque et en fonctionnement à proximité des domiciles des cas ne montraient pas de contamination en légionelles. Au niveau microbiologique, 4 souches ont été isolées et sérotypées par le CNR. Aucune concordance n'a été observée entre les sources.

Conclusion : Un regroupement spatio-temporel de 6 cas de légionellose sur 2 semaines à Tours faisait suspecter une source de contamination commune. L'analyse des fréquentations n'a pas permis d'identifier des lieux communs à l'ensemble des cas. L'enquête environnementale n'a révélé aucune source de contamination commune. Par ailleurs, les résultats de typage des souches patients par le CNR ont montré des différences entre les quatre souches analysées. L'utilisation de l'application de visualisation cartographique a permis de repérer rapidement les cas groupés et d'identifier l'emplacement des TAR situées dans un périmètre de 3 km autour de leurs domiciles et déplacements.

Influence de la position des spacers sur l'efficacité de la défense par le système CRISPR de *Legionella pneumophila*.

P13

Christophe GINEVRA¹⁻⁶, Nathalie JACOTIN¹⁻⁶, Tom GEISSMANN²⁻⁵, François VANDENESCH²⁻⁶, Gérard LINA²⁻⁶, Jérôme ETIENNE²⁻⁶ Patricia DOUBLET¹⁻⁵ and Sophie JARRAUD¹⁻⁶

¹ CIRI, International Center for Infectiology Research, Legionella pathogenesis Team, Université de Lyon, Lyon, France.

² Inserm, U1111, Lyon, France.

³ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

⁴ Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France.

⁵ CNRS, UMR5308, Lyon, France.

⁶ Centre National de Référence des Légionelles, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Les systèmes CRISPR/cas sont impliqués dans la défense des bactéries contre les ADN exogènes (phages, plasmides...). Ces systèmes sont évolutifs, ils permettent à la bactérie d'acquérir de nouvelles résistances après exposition à un ADN exogène. Nous avons étudié la fonctionnalité de 2 systèmes CRISPR/cas présents chez *Legionella pneumophila*. Nous avons pu démontrer que ces deux systèmes sont fonctionnels pour des résistances déjà acquises. De plus, un gradient de d'efficacité de la défense a été mis en évidence en fonction de la position du spacer dans le crRNA : plus le spacer est proche de la séquence promotrice, plus la défense est efficace. Cette efficacité est corrélée avec la détection du spacer dans le crRNA mature. *L. pneumophila* possède donc de systèmes CRISPR/cas fonctionnels avec une efficacité plus importante pour les spacers acquis récemment.

Transfert du spoligotypage de *legionella pneumophila* sequence type 1/ pulsotype paris sur microbilles.

P14

MICHEL KIRÉOPORI GOMGNIMBOU^{1,2}, CHRISTOPHE GINEVRA³⁻⁸, CAROLINE PERON-CANE¹, MARGAUX VERSAPUECH¹, GUISLAINE REFREGIER¹, NATHALIE JACOTIN³⁻⁸, CHRISTOPHE SOLA¹ and SOPHIE JARRAUD³⁻⁸.

¹ Institut de Génétique et Microbiologie, UMR8621, CNRS-Université Paris-Sud 11, France

² Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

³ CIRI, International Center for Infectiology Research, Legionella pathogenesis Team, Université de Lyon, Lyon, France.

⁴ Inserm, U1111, Lyon, France.

⁵ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

⁶ Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France.

⁷ CNRS, UMR5308, Lyon, France.

⁸ Centre National de Référence des Légionelles, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Une technique de sous typage des souches ST1/pulsotype Paris a été récemment développée au Centre National de Référence des Légionelles (Spoligotypage). Cette technique est basée sur la détection en 42-plex par reverse dotblot de fragments spécifiques présents dans les motifs CRISPR. Dans cette étude, nous présentons le transfert de cette méthode de reverse dotblot sur membrane vers une technologie haut débit sur microbilles (Luminex 200® et MagPix®). Un premier jeu de 56 isolats a été utilisé pour valider les conditions expérimentales, puis un second jeu de 248 isolats a été testé en aveugle sur le Luminex 200® et le MagPix®. Les résultats obtenus entre les 2 méthodes sur microbilles sont 100% concordants, 6 discordances ont été observées par rapport aux résultats obtenus sur membranes. Ces discordances sont en cours de vérifications mais sont vraisemblablement dues à l'imprécision de lecture des membranes. Le transfert de la méthode de spoligotypage vers une méthode quantitative sur microbilles permet une augmentation de la robustesse des résultats. Le format haut débit de cette méthode permet d'envisager des études à plus grande échelle.

Légionellose nosocomiale en lien avec une contamination du réseau d'eau froide.

P15

K. MENSAH¹, S. JARRAUD², A. REGARD¹, T. BÉNET¹, P. CASSIER¹, E. MORELON³, C. POUTEIL-NOBLE³, P. VANHEMS¹, M.C. NICOLLE¹

¹Service d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon ;

²Centre National de Référence des Légionelles, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Bron ;

³Service de Néphrologie, Médecine de Transplantation et d'Immunologie Clinique, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

La gestion du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé repose sur une surveillance environnementale. Celle-ci prend en compte la recherche de *Legionella* et le suivi de des températures de l'eau chaude sanitaire (ECS) et de l'eau froide (EF), indicateur de contamination en sus des analyses.

Nous rapportons l'investigation clinique et environnementale d'un cas de légionellose nosocomiale en relation avec une exposition à l'eau froide.

Un patient de 62 ans, transplanté rénal en juillet 2012 et ayant présenté une infection à CMV en avril 2013, a été admis le 29 juillet 2013 (J0) pour détérioration de sa fonction rénale liée à un rejet aigu de son greffon entraînant une intensification de son traitement immunosuppresseur à J8. A J13, le patient a présenté une hyperthermie associée à une détresse respiratoire aiguë ayant conduit à un transfert en réanimation. L'antigénurie légionelle réalisée à son admission en réanimation était positive et le lavage broncho alvéolaire (LBA) réalisé le même jour a permis l'isolement d'une *L. pneumophila* séro groupe 1 (Séquence Type 1, profil PFGE Paris). Le traitement antibiotique a permis une évolution favorable. Une investigation environnementale a été réalisée.

L'ensemble des douches du service où le patient a été hospitalisé étaient déjà sécurisées par des filtres. Un échantillonnage de prélèvements de 8 points d'eau a été réalisé à J21 : ECS et EF des douches

communes et individuelles, ECS et EF des lavabos du service. Dans la chambre du patient, l'EF du lavabo avait une température de 22,2°C et une concentration de *L. pneumophila* séro groupe 1 qui atteignait 25 000 UFC/L. Cette souche environnementale présentait les mêmes caractéristiques que la souche du patient : ST1, profil PFGE Paris, sous-groupe Olda. Tous les autres contrôles réalisés à J21 étaient négatifs (<250 UFC/L). Un nouvel échantillonnage sur 4 points d'EF a eu lieu à J25 pour évaluer l'extension de la contamination. Les contrôles se sont avérés négatifs. De nouveaux contrôles à J35, après des soutirages répétés de l'EF, étaient négatifs. Par ailleurs, aucun autre cas de légionellose nosocomiale n'a été identifié sur l'établissement.

La contamination a probablement eu lieu à partir d'aérosols contaminés de l'eau froide d'un lavabo. Ce cas souligne l'importance de la surveillance régulière des températures d'eau froide, notamment en période estivale, et pose la question de l'opportunité d'une surveillance microbiologique de l'eau froide dans les services accueillants des patients immunodéprimés.



Liste des participants

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
1	ADER Florence	MCU/PH	Service Maladies Infectieuses et Tropicales HOP Croix Rousse 69004 LYON	florence.ader@chu-lyon.fr	04 72 07 15 60
2	AHMED Sandra	Doctorante	Laboratoire UMR 6270 CNRS 76130 MONT SAINT AIGNAN	sandra.ahmedlecheheb@univ-rouen.fr	02 35 14 00 76
3	AKLI Bonaziz	Responsable des Ventes	Laboratoire Nephrotek 94524 RUNGIS Cedex	leuc@nephrotek.fr	01 46 87 12 82
4	ALLEGRA Séverine	Enseignant chercheur	GIMAP Faculté de Médecine 42003 SAINT ETIENNE	severine.allegra@univ-st-etienne.fr	06 75 70 88 15
5	ALLOMBERT Julie	Doctorante	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	julie.allobmert@etu.uni-lyon1.fr	
6	ANDREA Claire	Adjoint Technique	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	claire.andrea@univ-lyon1.fr	
7	ANDREOLLI Arnaud	Responsable produits Hygiène de l'eau	GEORGFISCHER, Hauptstrasse 130 SISSACH CH-450 SUISSE	arnaud.andreolli@georgfischer.com	00 41 79 792 15 85
8	ARNET Daniel	MSc ETH, Energie Effizienz	BMG Engineering AG, CH-8952 SCHLIEREN , SWITZERLAND	daniel.arnet@bmgeng.ch	+41 44 732 92 10
9	ATTAIECH Laetia	Post-Doc	UMR5240 69100 VILLEURBANNE	laetia.attaiech@univ-lyon1.fr	04 58 22 04 72
10	AUZET-CAILLAUD Michelle	technicien sanitaire	ARS PACA 132 BIs de Paris 13331 MARSEILLE Cedex3	michelle.auzetcaillaud@ars.sante.fr	04 13 55 89 17
11	BADIOU Cédric	Ingénieur	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	cedric.badiou@univ-lyon1.fr	04 78 77 86 57
12	BAILLEUX Clarisse	Technicien sanitaire	ARS Rhône Alpes, 69003 LYON	clarisse.bailleux@ars.sante.fr	04 72 34 74 38
13	BAILLO Nathalie	Technicienne CNRS/étudiante	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	nathalie.baillo@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 66
14	BANZ Alice	Chercheur	BioMérieux Chemin de l'orme 69280 MARCY L'ETOILE	alice.benz@biomerieux.com	04 78 87 20 00
15	BARBAROSSA Sheila	Biologiste	via Mirasole 22A, BELLINZONA, SUISSE	sh.bio@hotmail.com	00 4176 3683632
16	BASSI Clément	Epidémiologiste	Cellule INVS CIRE Ile de France 75019 PARIS	clement.bassi@ars.sante.fr	01 44 02 08 21
17	BAUDE Jessica	Ingénieur Etudes	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	jessica.baude@inserm.fr	04 78 77 86 57
18	BAUME Maud	Ingénieure Qualité	CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	maud.baume@chu-lyon.fr	04 72 15 52 58
19	BEAUTE Julien	ECDC	ECDC 171 83 STOCKHOM, SUEDE	julien.beaute@ecdc.europa.eu	00 46 (0)8 58 60 14 65
20	BELAUBE Bérengère	Pharmacienne Biologiste	mairie de TOULON 83000 TOULON	bbelaube@mairie-toulon.fr	06 43 68 46 57
21	BELMONTE Josiane	Directrice	BIOQUAL 09100 PAMIERS	j.belmonte@laboratoire-bioqual.fr	05 31 01 21 60
22	BEN HADJALI Hafida	secrétaire	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	hafida.benhadj-ali@chu-lyon.fr	04 72 12 96 25
23	BENITO Yvonne	Ingénieur	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	yvonne.benito@chu-lyon.fr	04 72 68 13 24
24	BERJEAUD Jean Marc	Professeur	EBI UMR CNRS 7267 Université de POITIERS	jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 06
25	BERTELLI LOMBARDO Claire	PhD	Center for Research on Intracellular Bacteria, University Hospital Center Bugnon 48, 1011 LAUSANNE, SUISSE	Claire.Bertelli@chuv.ch	00 41 21 314 03 73
26	BIGOT Renaud	Doctorant ATER	EBI equipe MDE Université de POITIERS	renaud.bigot@univ-poitiers.fr	
27	BILLOUD Aline	Cadre de Santé	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	aline.billoud@chu-lyon.fr	04 72 11 89 92
28	BINET Marie	Ingénieur Chercheur	EDF R&D 78400 CHATOU	marie.binet@edf.fr	01 30 87 86 41
29	BON Brigitte	Technicienne CNR	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	brigitte.bon@chu-lyon.fr	
30	BONHOMME Elodie	Ingénieur technico Commerciale	MERIDIAN 34 rue de Ponthieu 75008 PARIS	elodie.bonhomme@meridiandbioscience.eu	06 11 19 31 08
31	BONNAUD-DELAMARE Maxime	Ingénieur Santé Environnement	Mairie de Lyon 60 rue de Sèze 69006 LYON	maxime.bonnaud@mairie-lyon.fr	04 72 83 16 14 63
32	BORGEY Christelle	Technicienne sanitaire	ARS 38032 GRENOBLE	christelle.borgey@ars.sante.fr	04 76 63 65 42
33	BOUCHIAT Coralie	AHU	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	coralie.bouchiat@chu-lyon.fr	04 27 85 52 57
34	BOURDEAU PATOT Sabine	Post Doc	Faculté de Médecine Laennec 69008 LYON	sabine.boudeau-patot@inserm.fr	04 78 77 86 57
35	BOUTELEUX Céline	Ingénieur Chercheur	EDF R&D 78400 CHATOU	celine.bouteleux@edf.fr	01 30 87 70 30
36	BOUTON Martine	Secrétaire	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	martine.bouton@chu-lyon.fr	04 72 12 96 23

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
37	BREGERON Isabelle	Secrétaire	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	isabelle.bregeron@chu-lyon.fr	04 72 12 96 22
38	BRUNEL Romain	Doctorant	UMR5240 69100 VILLEURBANNE	brunel.r@gmail.com	04 72 44 58 22
39	BUCHRIESER Carmen	Directeur Recherche	I Pasteur PARIS	cbuch@pasteur.fr	01 45 68 83 72
40	BUCHWALTER Valérie	Secrétaire	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	valerie.buchwalter@chu-lyon.fr	04 72 12 96 21
41	CALVO Marilyn	Responsable Service	Contrôle Sanitaire Aliments/eaux LD13 29 rue F Joliot Curie 13013 MARSEILLE	marilyne.calvo@cg13.fr	04 13 31 90 00
42	CAMPESE Christine	Epidémiologiste	InVS, 12 rue du Val d'Osne 94410 St MAURICE	c.campese@invs.sante.fr	01 41 79 67 72
43	CANTIN Philippe	Microbiologiste PhD	Centre d'expertise en analyse environnementale du QUEBEC, CANADA	philippe.cantin@mddefp.gouv.qc.ca	418 643-1301, poste 228
44	CARDENAS Antonio	Responsable IUL France	MIBI, 672 rue du Mas de Verchant 34000 MONTPELLIER	acardenas@iul-instruments.fr	+34 605801029
45	CARLIER Damien	Ingénieur hygiéniste	Laboratoire Hygiène Ville de Paris	damien.carlier@paris.fr	01 44 97 87 87
46	CASSIER Pierre	AHU	Laboratoire Hygiène Hospitalière GH E Herriot 69003 LYON	pierre.cassier@chu-lyon.fr	04 72 11 07 21
47	CHALLEMEL Olivier	Technicien	Laboratoire Hygiène Ville de Paris	olivier.challemel@paris.fr	01 44 97 88 14
48	CHAPALAIN Annelise	Maître de Conférences	CIRI U1111 UMR-CNRS UMR5308 7 rue Guillaume Paradin 69008 LYON	annelise.chapalain-guillemot@univ-lyon1.fr	04 78 77 86 42
49	CHAPERON Gilles	Directeur Technique	CAPSIS 91940 LES ULIS	gilles.chaperon@capsis.fr	01 69 28 29 67
50	CHARPENAY Muriel	Ingénieur Technico-Commercial	INGEN S.A. 91380 CHILLY MAZARIN	muriel.charpenay@ingen.fr	06 73 07 13 60
51	CHARPENTIER Xavier	CR1INSERM	CNRS UMR5240 10 rue R Dubois 69100 VILLEURBANNE	xavier.charpentier@univ-lyon1.fr	04 72 44 58 22
52	CHASTANG Joelle	Technicienne CNR	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	joelle.chastang@chu-lyon.fr	
53	CHE Didier	Epidémiologiste	InVS, 12 rue du Val d'Osne 94410 St MAURICE	d.che@invs.sante.fr	01 41 79 67 30
54	CHEFSON GIRAULT Christine	PH Hygiène	CHU ROUEN	christine.chefson-girault@chu-rouen.fr	02 32 88 86 32
55	CODONY Francesc	Responsable scientifique	GENIUL_Parc UPC, EDIF.GAIA-TR14 Rambla San Nebridi 2, 08222 TERRASSA , ESPAGNE	fcodony@geniul.com	+34 650116910
56	COMTE Audrey	Technicien sanitaire	ARS délégation de l'Ain 01 BOURG EN BRESSE	audrey.comte@ars.sante.fr	04 81 92 12 83
57	CONZA Liza	PhD student	Istituto cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22, 6500 BELLINZONA SUISSE	lisaconza@gmail.com	+41079 413 82 70
58	CORNET Raphael	Délégué technico Commercial	BIO RAD 3 bld R Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE	raphael.cornet@bio-rad.com	01 47 95 62 31
59	COUDRAIS Stéphanie	Technicien BioHygiéniste	Unité d'Hygiène CH LYON SUD	stephanie.coudrais@chu-lyon.fr	04 78 86 12 68
60	COULIBALY Kalpy Julien	Médecin Microbiologiste Attaché Recherche	Institut Pasteur et Université de Cocody ABIDJAN, COTE D'IVOIRE	kalpyjulienoulibaly@pasteur.ci	22507915176
61	CUN Christine	Ingénieur	ARS 38032 GRENOBLE	christine.cun@ars.sante.fr	04 76 63 64 56
62	DAUWALDER Olivier	Pharmacien Biologiste PH	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	olivier.dauwalder@chu-lyon.fr	04 72 12 96 69
63	DAVID Benoit	Chef de produits Agro Alimentaire	BIOMERIEUX 69280 MARCY L'ETOILE	benoit.david@biomerieux.com	06 78 03 30 98
64	DELCAAMP Sophie	commercial	BIOMERIEUX 69280 MARCY L'ETOILE	sophie.delcamp@biomerieux.com	04 78 87 20 00
65	DESAUBLIAUX Bénédicte	Infirmière	CUAGS ARS des Pays de Loire 44262 NANTES Cedex2	benedicte.desaubliaux@ars.sante.fr	02 49 10 42 10
66	DESCOURS Ghislaine	Biologiste	CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	ghislaine.descours@chu-lyon.fr	04 72 12 96 64
67	DOLEANS JORDHEIM Anne	MCJU-PA	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	anne.doleans-jordheim@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 68
68	DOUBLET Patricia	Professeur/Chef d'Equipe	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	patricia.doublet@univ-lyon1.fr	04 72 44 81 05
69	DROGUET Jérôme	Ingénieur référent	DAT/HCL 49 rue Villon 69373 LYON	jerome.droguet@chu-lyon.fr	06 88 82 18 56
70	DROITCOURT Karine	Technicienne CNR	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	karine.droitcourt@chu-lyon.fr	

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
71	DUGOUR Laurent	Technicien sanitaire	Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherche 15013 AURILLAC	ldugour@cg15.fr	04 71 45 58 80
72	DUKAN Sam	Responsable équipe CNRS	31 chemin Joseph Aiguire 13402 MARSEILLE	sdukan@ifr88.cnrs-mrs.fr	0491164601
73	EL ADDOULI Marie	Médecin Biologiste	CH TARBES 65013 TARBES	meladdouli@ch-tarbes-vic.fr	05 62 54 54 40
74	EPALLE Thibaut	Doctorant	Université SAINT ETIENNE	thibault.epalle@univ-dt-etienne.fr	04 77 42 14 67
75	ETIENNE Jérôme	PU-PH	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	jerome.etienne@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 72
76	FAVARD Sébastien	Responsable commercial Nord France	INTERSCIENCE 78860 SAINT NOM LA BRETECHE	info@interscience.fr	01 34 62 62 61
77	FAVARD-ENNACHACHIBI Mireille	Pharmacien-Biologiste	Laboratoire Charles Nicolle 21 place Louis Pasteur CASA-BLANCA, MAROC	labocharlesnicolle@gmail.com	022 49 26 74
78	FEREC Christelle	Cadre de Santé	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	christelle.ferec@chu-lyon.fr	04 72 19 24 86
79	FLIEGER Antje	Head Division	Enteropathogenic Bacteria and Legionella, Robert Koch Institute D38855 WERNIGERODE ALLEMAGNE	fliegera@rki.de	0049-30-18754-2522
80	FORESTIER Virginie	Délégué technico Commercial	BIO RAD 3 bld R Poincarre 92430 MARNES LA COQUETTE	virginie.forestier@bio-rad.com	01 47 95 62 31
81	FOREY Françoise	Biologiste	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	francoise.forey@chu-lyon.fr	04 72 12 96 63
82	FREYDIERE Anne Marie	Biologiste	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	anne-marie.freydiere@chu-lyon.fr	04 72 12 96 59
83	FUCHE Fabien	Doctorant	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	fabien.fuche@etu.univ-lyon1.fr	04 72 43 13 66
84	FUHRMANN Christine	Médecin Biologiste	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	christine.fuhrmann@chu-lyon.fr	04 72 15 52 59
85	GAIA Valeria	Responsable CNR légionelles	Servizio di Microbiologia EOLAB BELLINZONA SUISSE	valeria.gai@eoc.ch	+41 91 81 11 17 18
86	GARDES Sophie	PH	Unité d'Hygiène CH LYON SUD	sophie.gardes@chu-lyon.fr	04 78 86 12 68
87	GEISSMANN Tom	Chercheur Inserm CR1	U1111, Faculté de Médecine Laennec 69372 LYON	tom.geissmann@inserm.fr	04 78 77 86 57
88	GICQUEL Claude	Délégué Commercial	GIRPI 76700 HARFLEUR	cgicquel.girpi@allaxis.com	02 32 79 60 00
89	GILBERT Christophe	Maitre de Conférences	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	christophe.gilbert.bio@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 66
90	GINEVRA Christophe	Chargé Etudes	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	christophe.ginevra@univ-lyon1.fr	07 78 77 86 42
91	GIRARD Raphaelle	PH	Unité d'Hygiène CH LYON SUD	raphaele.girard@chu-lyon.fr	04 78 86 12 68
92	GIRARDO Pascale	Biologiste	Laboratoire Bactériologie CBE GHE 69500 BRON	pascale.girardo@chu-lyon.fr	04 72 12 96 70
93	GOMEZ-VALERO Laura	Assistante de Recherche	Institut Pasteur PARIS	laura.gomez-valero@gmail.com	06 68 56 10 33
94	GREUB Gilbert	Professeur -Médecin Chef	Institut de Microbiologie, LAUSANNE SUISSE	Gilbert.Greub@chuv.ch	+41 (0)21 314 4979
95	GRUENWALD Marie-Laure	Post-Doc	UMR5240 10 rue Rapahel Dubois 69100 VILLEURBANNE	marie-laure.grunenwald@univ-lyon1.fr	
96	GSTALER Marie-Eve	Ingénieur R et D	Cylergie R et D 18 avenue Tony Garnier 69007 LYON	gstaler.marie-eve@cofely-gdfsuez.com	04 72 86 09 31
97	GUEDEAU Géraldine	Responsable Qualité	BIOQUAL 09100 PAMIERS	infos@laboratoire-bioqual.fr	05 31 01 21 60
98	GUICHET Aurélie	ASM eaux et Environnement	EUROFINS NANTES	AurelieGuichet@eurofins.com	03 89 22 38 05
99	GUILLOT Nicolas	Responsable commercial Sud France	INTERSCIENCE 78860 SAINT NOM LA BRETECHE	info@interscience.fr	01 34 62 62 61
100	HALLIER Sylvie	Responsable R et D	PALL 1 rue du Courtil-Centre CICEA 35170 BRUZ	sylvie_hallier@europe.pall.com	02 99 05 57 90
101	HECHARD Yann	Professeur	UMR/CNRS7267 1 rue G Bonnet 86022 POITIERS	yann.hechard@univ-poitiers.fr	05 49 45 40 07
102	HIERNAUX Pierre	Directeur Technique	MAGNUS 1271 Ampère J4B 525 BOUCHERVILLE, Qc, CANADA	phiernaux@magnus.ca	001 450 655 1344
103	JACOTIN Nathalie	Technicienne	CNR légionelles, INSERM 1111 69008 LYON	nathalie.jacotin@chu-lyon.fr	04 72 12 96 22
104	JACQUINET Stéphanie	Médecin hygiéniste	Ministère de la Cté française DG Santé, BRUXELLES, BELGIQUE	stephanie-jacquinet@cfwb.be	02 413 35 21
105	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
106	JUAN Pierre Alexandre	Doctorant	UMR5240 69100 VILLEURBANNE	pierre-alexandre.juan@etu.univ-lyon1.fr	04 58 22 04 72

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
107	KAY Elisabeth	Chargé de Recherche CNRS	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	ekay@ujf-grenoble.fr	
108	KHODR Ahmad	Chercheur post doc	Institut Pasteur PARIS	khodr.ahmad@pasteur.fr	01 45 68 95 40
109	KIRCHHOFFER Matthieu	Expert Traitement eaux-Risques sanitaires	COFELY Tour Voltaire 92059 LA DEFENSE Cedex	matthieu.kirchhoffer@cofely-gdfsuez.com	06 69 29 36 82
110	LAKEHAL Yamina	secrétaire	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	yamina.lakehal@chu-lon.fr	04 72 12 96 24
111	LANTERNIER Fanny	MCU PH	Service Maladies Infectieuses Hôp Necker 75015 PARIS	fanny.lanternier@nck.aphp.fr	06 63 41 45 96
112	LAPADESCU Carmen	Directeur technique	AQUAPROX 6 rue Barbes 92305 LEVALLOIS	c.lapadescu@proxis-developpement.com	01 81 93 00 91
113	LARUE Fabien	Directeur	Laboratoire Nephrotek 94524 RUNGIS Cedex	leuc@nephrotek.fr	01 46 87 12 82
114	LAURENT Frédéric	Biologiste PH codirecteur CNR staphylocoques	Bactériologie Hôp Croix Rousse 69004 LYON	frederic.laurent@univ-lyon1.fr	04 72 07 18 39
115	LAWRENCE Christine	Praticien en Hygiène et Microbiologiste	Hôpital Poincaré 92380 GARCHES	christine.lawrence@rpc.aphp.fr	01 47 10 77 25
116	LAYS Claire	Post Doc	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	claire.lays@inserm.fr	04 78 77 86 57
117	LE CANN Pierre	Enseignant chercheur	EHESP 35043 RENNES	pierre.lecann@ehesp.fr	
118	LE FLECHER Gaelle	Commercial	PALL 1 rue du Courtil-Centre CICEA 35170 BRUZ	Gaelle_LeFlecher@europe.pall.com	06 88 13 52 26
119	LEBIHAN Yann	Marketing Manager Industrie	THERMOFISHER 69570 DARDILLY	yann.lebihan@thermofisher.com	04 72 52 33 78
120	LELOGEAIS Virginie	Doctorante	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	virginie.lelogeais@gmail.com	
121	LINA Gérard	PU-PH co-directeur CNR légionelles	CNR légionelles, INSERM 1111 69008 LYON	gerard.lina@univ-lyon1.fr	04 72 12 96 67
122	LOISEAU Clémence	Doctorante	EBI UMR CNRS 7267 Université de POITIERS	clémence.loiseau@univ-poitiers.fr	05 49 45 37 65
123	MAGNE Sébastien	Ingénieur sanitaire	ARS Auvergne DT-Cantal 15005 AURILLAC	sebastien.magne@ars.sante.fr	04 63 27 30 03
124	MARAYEN Soodarsen	Auditeur Qualité	Groupe LACTALIS 53000 LAVAL	soodarsen.marayen@lactalis.fr	06 82 97 13 62
125	MARION Solenne	5AHU	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	solenne.marion@laposte.net	04 72 12 96 19
126	MARQUET Marie Françoise	Marketing Manager Clinique	THERMOFISHER 69570 DARDILLY	marie.francois.marquet@thermofisher.com	04 72 52 33 79
127	MARSAC Audrey	Chef de produits milieu de culture	BIOMERIEUX 69280 MARCY L'ETOILE	audrey.marsac@biomerieux.com	04 78 87 70 95
128	MAURICE-BLANC Cécile	Docteur en Microbiologie	763 Faubourg Montmélias 73000 CHAMBERY	cecile.maurice-blanc@orange.fr	06 22 00 64 56
129	MAURIN Max	PU-PH	CHU Grenoble 38043 GRENOBLE	mmaurin@chu-grenoble.fr	04 76 76 54 79
130	MEBARKI Farida	Directeur Laboratoire	BIOFIDAL-DTAMB 170 av G Péri 69120 VAULX EN VELIN	fmebarki@biofidal.com	04.37.45.02.96
131	MEKKOUR Mariam	Doctorante	I Pasteur CASABLANCA, MAROC	m.mariam06@gmail.com	+ 212 610 394 117
132	MENARD Céline	Biologiste	Microbiologie CHU STRASBOURG	celine.menard@chu-strasbourg.fr	03 69 55 14 29
133	MENUJER Luce	Epidémiologiste	ARS Centre 45044 ORLEANS	luce.menujer@ars.sante.fr	02 38 77 47 47
134	MEUGNIER Hélène	Ingénieur	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	helene.meugnier@chu-lyon.fr	07 72 12 95 80
135	MICHALEWICZ Christine	MISP	ARS des Pays de Loire 44262 NANTES Cedex2	christiane.michalewicz@ars.sante.fr	02 49 10 42 54
136	MICHARD Céline	Doctorante	CIRI 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	cel.michard@orange.fr	
137	MICHEL Laurent	Commercial	PALL 1 rue du Courtil-Centre CICEA 35170 BRUZ	Laurent_Michel@europe.pall.com	
138	MOREAU Karen	PU	CIRI labo Bactério 7 rue Guillaume paradin 69372 LYON	karen.moreau@univ-lyon1.fr	04 78 77 86 57
139	MOSNIER Amandine	Assistante Ingénieur	Bactériologie Faculté de Médecine Laennec 69008 LYON	amandine.mosnier@univ-lyon1.fr	06 79 64 51 01
140	MUSTAPHA Pascale	ATER	GIMAP Faculté de Médecine 42003 SAINT ETIENNE	pascale.mustapha@gmail.com	
141	NEYRAT Lucie	Interne Pharmacie	Labo Hygiène CHU STRASBOURG	lucie.neyrat@chru.strasbourg.fr	03 69 55 14 29
142	NICOLLE Marie Christine	Médecin Hygiéniste	HCL-GHE Unité d'Hygiène et Epidémiologie LYON	marie-christine.nicolle@chu-lyon.fr	04 72 11 07 19

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
143	NOUVELLON Michèle	Praticien Hospitalier	Laboratoire d'Hygiène CHU ROUEN	michele.nouvelon@chu-rouen.fr	02 32 88 86 32
144	OGER-DUROY Cécile	Chef Produit International	BIO RAD 3 bld R Poincarré 92430 MARNES LA COQUETTE	cecile.oger-duroy@bio-rad.com	01 47 95 62 31
145	PARIS Patrick	Président Association	CAPRIS 149 avenue du Maine 75014 PARIS	infos@capris.asso.fr	01 45 45 25 38
146	PAYET Fabrice	Manager des risques opérationnels	Espace Port de Flandre 11 rue de Cambrai 75947 PARIS cedex 19	fabrice.payet@fr.groupeupcp.com	06 45 85 24 50
147	PECASTAINGS Sophie	Post Doctorante	Faculté de Pharmacie UMR 5503 31062 TOULOUSE	sophie.pecastaings.net	05 61 25 95 72
148	PERRIN Florent	Ingénieur	ARIONIC 92500 RUEIL MALMAISON	info@arionic.com	01 41 42 36 81
149	PINON Anthony	Chargé d'Etudes	Institut Pasteur 59019 LILLE	anthony.pinon@pasteur.fr	03 20 87 72 63
150	PLANEL Amélie	TGS	ARS Rhône Alpes, 69003 LYON	amelie.planel@ars.sante.fr	04 72 34 74 14
151	PLEZ Philippe	Ingénieur Technico Commercial	ALERE 78350 JOUY en JOSAS	philippe.plez@alere.com	01 39 46 83 18
152	POIRIER Rémi	Chef de Projet ANSES	Direction de l'évaluation des risques de l'Anses 94701 MAISONS ALFORT Cedex	remi.poirier@anses.fr	01 56 29 15 98
153	PORTIER Emilie	Doctorante	EBI équipe MDE Université de POITIERS	portier.emilie@univ-poitiers.fr	05 49 45 36 19
154	POTIER Alexandre	Responsable Technique	GIRPI 76700 HARFLEUR	apotier.girpi@allaxis.com	02 32 79 60 00
155	POTTIER Sébastien	Ingénieur	ARIONIC 92500 RUEIL MALMAISON	info@arionic.com	01 41 42 36 81
156	PRUNE Laurent	Technicien	LDS72 72000 LE MANS	laurent.prune@cg72.fr	06 15 73 87 49
157	RADIGUET Marie Claire	Responsable Laboratoire	CAPSIS 91940 LES ULIS	mc.radiguet@capsis.fr	01 69 28 29 67
158	RAGOZIN Nathalie	Médecin Veille Sanitaire	ARS Délégation Drôme 26000 VALENCE	nathalie.ragozin@ars.sante.fr	04 75 79 71 54
159	REYROLLE Monique	Ingénieur	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	monique.reyrolle@chu-lyon.fr	04 72 12 95 81
160	RIFFARD Serge	Professeur des Universités	GIMAP Faculté de Médecine 42003 SAINT ETIENNE	serge.riffard@univ-st-etienne.fr	06 07 75 16 62
161	ROBERT Stéphane	Auditeur Qualité	Groupe LACTALIS 53000 LAVAL	stephane.robert@lactalis.fr	06 10 12 72 88
162	ROISIN Sandrine	Médecin Microbiologiste	CNR légionelles Hôpital Erasme BRUXELLES, BELGIQUE	sandrine.roisin@erasme.ulb.ac.be	00 32 2 55 3110
163	ROTTIERS Sylvianne	Technologue	CNR légionelles Hôpital Erasme BRUXELLES, BELGIQUE	sylvianne.rottiers@ulb.ac.be	00 32 2 555 8349
164	ROUSSELIN Philippe	Regulatory Manager	IDEXX BP50232 95614 CERGY PONTOISE	Philippe-Rousselin@idexx.com	01 69 28 04 94
165	SBOUI Deja	Doctorante	GIMAP Faculté de Médecine 42003 SAINT ETIENNE	dejlas@yahoo.fr	
166	SHADOUH Lubana	Doctorante	CHU de GRENOBLE et LAPM	lshadoud@chu-grenoble.fr	04 76 76 54 79
167	SIFFERT Marielle	Technicienne CNR	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	marielle.siffert@chu-lyon.fr	
168	SOLET Jean Louis	Ingénieur épidémiologiste	ARS Océan Indien 97743 SAINT DENIS cedex09	jean-louis.solet@ars.sante.fr	02 62 93 95 41
169	SOREAU Sylvie	Ingénieur Chercheur	EDF R&D 78400 CHATOU	sylvie.soreau@edf.fr	01 30 87 77 86
170	SQUINAZI Fabien	Médecin Biologiste	10 boulevard Jourdan 75014 PARIS	squinazi@club-internet.fr	06 07 67 47 40
171	STOLL Jeanine	Médecin Epidémiologiste	ARS de Bourgogne -CIRE 21000 DIJON	jeanine.stoll@ars.sante.fr	03 80 41 99 29
172	TENDEL Claudia	Senior Marketing Specialist	BIO RAD 3 bld R Poincarré 92430 MARNES LA COQUETTE	claudia.tengel@bio-rad.com	01 47 95 62 31
173	TILLAUT Hélène	Ingénieur épidémiologiste	ARS Bretagne 35042 RENNES cedex	helene.tillaut@ars.sante.fr	02 22 06 74 77
174	TOURON-BODILIS Aurélie	Ingénieur Chercheur	EDF R&D 78400 CHATOU	aurilie.touron-bodilis@edf.fr	01 30 87 79 59
175	VAISSIERE Emmanuelle	Ingénieur Sanitaire	CIRE Auvergne ARS CLERMONT FERRAND	emmanuelle.vaissiere@ars.sante.fr	04 73 74 50 41
176	VANDENESCH François	PU-PH chef de service	Bactériologie CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	francois.vandenesch@univ-lyon1.fr	04 72 15 72 52
177	WANDEWALLE Marine	Doctorante	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	marinevandewalle@hotmail.fr	06 16 36 20 97
178	VERDON Julien	Maître de Conférence	EBI UMR CNRS 7267 Université de POITIERS	julien.verdon@univ-poitiers.fr	05 49 45 36 93
179	VERGER Thomas	Stagiaire Data Manager	CNR légionelles CBE 59 Bld Pinel 69677 BRON	thomas.verger1@estb.ucly.fr	06 99 53 22 04

	Nom	Activité	Adresse	E-mail	Tél.
180	VERMANDER Mieke	Spécialiste Produit	MERIDIAN 34 rue de Ponthieu 75008 PARIS	mieke.vermander@meridianbioscience.eu	01 42 56 04 40
181	VIANNEY Anne	Maitre de Conférence	UCBL Bat Lwoff 10 rue R Dubois 69622 VILLEURBANNE	anne.vianney@univ-lyon1.fr	04 72 43 13 67
182	VILLE Laurent	Chef de Produits	ALERE 78350 JOUY en JOSAS	laurent.ville@alere.com	01 39 46 64 80
183	VINCENT Florence	Ingénieur	CIRI Inserm U1111 69008 LYON	florence.vincent@univ-lyon1.fr	04 78 77 86 57
184	WALLET France	Médecin	EDF carré Vert 98309 LEVALLOIS PERRET	France.wallet@edf.fr	01 32 24 84 92
185	WATTEZ Emmanuelle	Chef de Groupe ImmunoAnalyses et Maladies Infectieuses	INGEN S.A. 91380 CHILLY MAZARIN	emmanuelle.wattez@ingen.fr	01 69 79 18 27
186	WON Jean Marc	Epidémiologiste	CIRE Rhône Alpes 69003 LYON	jean-marc.yvon@ars.sante.fr	04 72 34 41 64
187	SEBIRE Bernard	Régisseur ENS LYON	46 allée Italie 69007 LYON	bernard.sebire@ens-lyon.fr	06 87 28 53 10
188	Sécurité	AXIOM Sécurité	99 rue de gerland 69362 LYON Cedex 07	axiomsecurite@groupeartelis.fr	0 820 280 280
189 190 191	Accueil, Micros (3 stagiaires)	Ecole TUNON	19 place Tolozan 69001 LYON	tunon.lyon@wanadoo.fr	04 78 28 85 16
192 193 194 195	Animations ENS et Musiciens Quat'Sax	SOLUSCENE	ZA La Croisette 69490 PONTCHARRA sur TURDINE	contact@soluscene.com	04 74 05 70 50
196	Abbaye de Collonges BOCUSE	Diner du 26/11/2013	69660 COLLONGES AU MONT D'OR	damien.gosmat@bocuse.fr/www.bocuse.fr	04 72 42 90 90

Liste arrêtée au 13 novembre 2013

SympoLegio

Lyon - 26 et 27 novembre 2013

SPONSORS



Lavoisier



PARRAINS

