



**HAL**  
open science

# Ecologie de *Legionella pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable

Vincent Thomas

► **To cite this version:**

Vincent Thomas. Ecologie de *Legionella pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable. Ecologie, Environnement. Université Paris Sud - Paris XI, 2004. Français. NNT: . tel-00116971

**HAL Id: tel-00116971**

**<https://theses.hal.science/tel-00116971>**

Submitted on 29 Nov 2006

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

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

**UNIVERSITÉ PARIS XI**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY**

**ÉCOLE DOCTORALE :**  
**INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ**  
**PÔLE : MICROBIOLOGIE / PARASITOLOGIE**

ANNÉE 2003-2004

SÉRIE DOCTORAT N°807

**THÈSE**

**Présentée**

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE  
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY  
UNIVERSITÉ PARIS XI

pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

par

Vincent THOMAS

**ÉCOLOGIE DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* DANS LES RESEAUX  
DE DISTRIBUTION D'EAU POTABLE**

Soutenue le : 05 avril 2004

JURY : M<sup>me</sup> Anne COLLIGNON, Professeur  
M<sup>r</sup> Jérôme ETIENNE, Professeur (Rapporteur)  
M<sup>r</sup> Yves LEVI, Professeur  
M<sup>r</sup> Jean-François LORET, Docteur  
M<sup>me</sup> Christine ROQUES, Docteur (Rapporteur)

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	2
REMERCIEMENTS .....	9
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....	12
LISTE DES ABREVIATIONS .....	16
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
INTRODUCTION GENERALE .....	20
I – LEGIONELLA PNEUMOPHILA : POINT SUR LES CONNAISSANCES .....	25
I-1. BIOLOGIE .....	25
I-1.1. Taxonomie.....	25
I-1.2. Caractères biologiques .....	27
I-1.3. Epidémiologie.....	27
I-1.4. Physiopathologie et clinique.....	28
I-1.5. Facteurs de virulence de <i>Legionella pneumophila</i> .....	30
I-1.5.1 Le système Dot/Icm.....	31
I-1.5.2 Autres facteurs de virulence .....	34
I-1.5.2.a. Structures de surface .....	34
I-1.5.2.b. Sécrétion et acquisition de métabolites.....	36
I-1.5.3.c. Infection des macrophages .....	37
I-1.5.3.d. Facteurs de virulence divers .....	37
I-1.5.3. Transfert conjugatif de la virulence chez <i>L. pneumophila</i> .....	38
I-1.6. Cycle intracellulaire de <i>Legionella pneumophila</i> .....	38
I-1.6.1. Evènements précoces .....	38
I-1.6.1.a. Phagocytose .....	38
I-1.6.1.b. Interception du trafic vésiculaire et inhibition de la fusion phagolyso.....	39
I-1.6.2. Réplication et fusion avec le réticulum endoplasmique.....	40
I-1.6.3. Sortie de la cellule .....	43
I-1.7. Cycle intra-amibien de <i>Legionella pneumophila</i> .....	43
I-1.8. Cycles intracellulaires (cellules mammifères et protozoaires) des autres espèces de légionelles .....	44
I-2. DETECTION ET TYPAGE DES LEGIONELLES .....	48
I-2.1. Détection des légionelles .....	48
I-2.1.1. Culture .....	48
I-2.1.2. Méthodes moléculaires.....	50
I-2.1.2.a. Extraction de l'ADN et PCR.....	50
I-2.1.2.b. Sondes ciblant l'ARN ribosomal .....	51
I-2.1.2.c. Autres méthodes .....	52
I-2.2. Diagnostic .....	53
I-2.2.1. Culture .....	53
I-2.2.2. Immunofluorescence directe .....	53
I-2.2.3. Détection des antigènes urinaires .....	54
I-2.2.4. Diagnostic sérologique : Immunofluorescence indirecte .....	54
I-2.2.5. Amplification génique .....	55
I-2.3. Typage .....	55
I-2.3.1. Discrimination des espèces et des sous-groupes .....	56
I-2.3.1.a. Protéines totales et acides gras cellulaires .....	56
I-2.3.1.b. Polymorphisme des séquences des gènes <i>mip</i> , <i>rpoB</i> et <i>dotA</i> .....	56

I-2.3.1.c. Polymorphisme de longueur de l'espace intergénique de l'ADNt.....	56
I-2.3.2. Discrimination des souches.....	57
I-2.3.2.a. Mobilité électrophorétique des enzymes.....	57
I-2.3.2.b. Sérotypage.....	57
I-2.3.2.c. ADN ribosomal.....	57
I-2.3.2.d. Amplification aléatoire du chromosome : AP-PCR et RAPD.....	58
I-2.3.2.e. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés : AFLP & IRS-PCR.....	59
I-2.3.2.f. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE).....	59
I-2.3.2.g. Séquences intergéniques : variable-number tandem repeats.....	60
I-2.3.2.h. Analyse de séquences.....	60
I-3. ECOLOGIE DE <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> .....	60
I-3.1. Besoins nutritifs.....	60
I-3.2. Présence dans l'environnement.....	61
I-3.3. Interactions connues avec d'autres espèces bactériennes.....	62
I-3.3.1. Inhibition.....	62
I-3.3.1.a. Inhibition par compétition ou bactéricidie.....	64
I-3.3.1.b. Parasitisme.....	64
I-3.3.2. Potentialisation.....	65
I-3.3.2.a. Bactéries.....	65
I-3.3.2.b. Cyanobactéries.....	66
I-3.4. Interactions connues avec des espèces eucaryotes.....	67
I-3.4.1. Amibes.....	69
I-3.4.2. Ciliés.....	70
I-3.4.3. <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	70
I-3.4.4. Algues vertes.....	71
I-3.5. Phages.....	71
II – FLORE DES RESEAUX.....	72
II-1. BACTERIES.....	73
II-1.1. Groupes et genres bactériens détectés dans les réseaux d'eau potable.....	73
II-1.1.1. Détection par culture.....	73
II-1.1.2. Détection par des sondes ciblant l'ARNr.....	74
II-1.1.3. Détection par analyse de l'ADN.....	75
II-1.1.4. Utilisation conjointe de plusieurs techniques.....	76
II-1.2. Espèces pathogènes pour l'Homme détectées dans les réseaux d'eau potable.....	76
II-1.2.1. <i>Gamma-Proteobacteria</i> .....	77
II-1.2.2. <i>Epsilon-Proteobacteria</i> .....	78
II-1.2.3. <i>Actinobacteria</i> .....	79
II-2. PROTOZOAIRES.....	79
II-2.1. Interactions protozoaires - bactéries.....	79
II-2.2. Protozoaires non pathogènes.....	80
II-2.3. Protozoaires pathogènes.....	81
II-3. AMIBES LIBRES.....	82
II-3.1. Ecologie.....	82
II-3.1.1. Présence dans l'environnement.....	82
II-3.1.2. Nutrition.....	83
II-3.1.3. Enkystement et résistance aux stress.....	83
II-3.2. Présence dans le circuit de production / distribution d'eau.....	84
II-3.2.1. Présence à la source.....	84
II-3.2.2. Présence dans le circuit de potabilisation / distribution.....	84
II-3.2.3. Présence dans les réseaux intérieurs.....	85



II-3.3. Pathogénicité intrinsèque .....	86
II-3.4. Endosymbiontes .....	86
II-3.4.1. Endosymbiontes potentiellement pathogènes pour l'Homme .....	88
II-3.4.1.a. <i>Alpha-Proteobacteria</i> .....	88
II-3.4.1.b. <i>Beta-Proteobacteria</i> .....	91
II-3.4.1.c. <i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i> .....	91
II-3.4.1.d. <i>Chlamydiales</i> .....	91
II-3.4.2. Endosymbiontes pathogènes avérés pour l'Homme .....	93
II-3.4.2.a. <i>Pathogènes capables de survivre dans les trophozoïtes sans s'y multiplier</i> .....	93
II-3.4.2.b. <i>Pathogènes capables de survivre et de se multiplier</i> .....	94
II-3.4.3. Virus .....	97
III- BIOFILM .....	98
III-1. FORMATION DU BIOFILM .....	98
III-1.1. Adhésion .....	98
III-1.1.1. Mécanismes .....	99
III-1.1.1.a. <i>Conditionnement des surfaces</i> .....	99
III-1.1.1.b. <i>Forces d'adhésion</i> .....	99
III-1.2. Facteurs modifiant l'adhésion .....	100
III-1.2.1. Composition des parois des micro-organismes .....	100
III-1.2.1.a. <i>Hydrophobicité et charges de surfaces</i> .....	100
III-1.2.1.b. <i>Pili et flagelles</i> .....	102
III-1.2.2. Facteurs environnementaux .....	102
III-1.2.2.a. <i>Physico-chimie du milieu</i> .....	102
III-1.2.2.b. <i>Nature du support</i> .....	103
III-1.2.2.c. <i>Hydrodynamique</i> .....	104
III-1.3. Constitution du biofilm .....	104
III-1.3.1. Exopolymères .....	104
III-1.3.2. Co-agrégation .....	105
III-1.4. Ecologie du biofilm mature .....	107
III-1.4.1. Mobilité des bactéries .....	107
III-1.4.2. Transferts de gènes .....	108
III-1.4.3. Interactions métaboliques et cataboliques .....	109
III-1.4.4. Biosurfactants .....	110
III-1.5. Facteurs environnementaux influençant le biofilm mature .....	111
III-1.5.1. Nutriments .....	111
III-1.5.2. Matériaux .....	112
III-1.5.3. Température .....	113
III-1.5.4. Hydrodynamique .....	113
III-1.6. Détachement du biofilm et mort cellulaire .....	114
III-2. COMMUNICATION INTER-CELLULAIRE .....	115
III-2.1. Introduction .....	115
III-2.2. Auto-inducteurs de type 1 .....	119
III-2.3. Auto-inducteurs de type 2 .....	122
III-2.3. Quorum-sensing et biofilms .....	123
III-2.3.1. Auto-inducteurs de type 1 .....	123
III-2.3.1.a. <i>Régulation du phénotype</i> .....	123
III-2.3.1.b. <i>Communication inter-espèces</i> .....	124
III-2.3.1.c. <i>Dégradation des AI-1 par des bactéries</i> .....	124
III-2.3.2. Auto-inducteurs de type 2 .....	125
III-2.3.2.a. <i>Régulation du phénotype</i> .....	125
III-2.3.2.b. <i>Communication inter-espèces</i> .....	126

<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>127</b>
<b>I- SUIVI DE LA COLONISATION D'UN RESEAU INTERIEUR PAR <i>L. PNEUMOPHILA</i> ....</b>	<b>128</b>
I-1. MISE EN PLACE ET SUIVI DES INCUBATEURS A BIOFILMS .....	128
I-1.1. Construction des incubateurs.....	128
I-1.2. Mise en place des incubateurs.....	129
I-1.2.1. Site choisi .....	129
I-1.2.2. Mise en eau des incubateurs et fréquence des prélèvements .....	130
I-1.2.3. Organisation des prélèvements et transport.....	130
I-2. ANALYSES RÉALISÉES .....	130
I-2.1. Détection des légionelles par culture .....	130
I-2.2. Typage des colonies isolées .....	131
I-2.2.1. Souches utilisées pour la validation de la méthode de typage.....	131
I-2.2.2. Extraction de l'ADN et typage.....	132
I-2.3. Détection des légionelles et de la flore totale dans les biofilms par FISH.....	133
I-2.3.1. Fixation des échantillons .....	133
I-2.3.2. Hybridation et observation.....	134
I-2.4. Paramètres physico-chimiques relevés.....	134
I-3. ESSAIS DE REALISATION DE BIOFILMS MIXTES : <i>L. PNEUMOPHILA</i> ISSUE DU RESEAU / ESPECES PARTICULIERES .....	135
I-3.1. Préparation des supports de biofilms .....	135
I-3.2. Préparation des biofilms.....	136
I-3.3. Injection de <i>L. pneumophila</i> et déroulement de l'étude.....	136
I-3.4. Analyses effectuées .....	137
I-3.4.1. Dénombrements .....	137
I-3.4.1.a. Phase planctonique.....	137
I-3.4.1.b. Biofilm .....	137
I-3.4.2. Observation microscopique des biofilms.....	137
<b>II- COMPARAISON DE L'EFFICACITE DES TRAITEMENTS DE DESINFECTION VIS-A-VIS D'UN RESEAU INTERIEUR COLONISE PAR <i>L. PNEUMOPHILA</i> .....</b>	<b>138</b>
II-1. TESTS D'INOCULATION DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> .....	138
II-1.1. Construction et colonisation de l'unité prépilote .....	138
II-1.2. Tests d'inoculation de <i>L. pneumophila</i> .....	139
II-1.2.1. Analyses avant inoculation .....	139
II-1.2.2. Inoculation .....	139
II-2. CONSTRUCTION ET COLONISATION DU PILOTE.....	139
II-2.1. Présentation du pilote .....	139
II-2.1.1. Schéma général .....	139
II-2.1.2. Prélèvements.....	142
II-2.1.3. Mesures de sécurité .....	142
II-2.2. Colonisation du pilote.....	143
II-3. ESSAIS DE DESINFECTION.....	143
II-3.1. Chlore.....	144
II-3.2. Electro-chloration .....	144
II-3.3. Dioxyde de chlore.....	144
II-3.4. Monochloramine.....	145
II-3.5. Cuivre-Argent .....	145
II-3.6. Ozone.....	145
II-4. ESSAIS DE RECOLONISATION .....	146
II-5. METHODES D'ANALYSE .....	146
II-5.1. Analyses par culture.....	146
II-5.2. Analyses après marquage fluorescent.....	146
II-5.2.1. Marquage de viabilité des biofilms .....	146

II-5.2.2. Marquage des groupes bactériens des biofilms .....	147
II-5.2.3. Microscopie confocale et analyse d'images .....	148
II-5.2.3.a. Acquisition des images en microscopie confocale .....	148
II-5.2.3.b. Analyse informatique des images .....	149
<b>III- AUTO-INDUCTEURS .....</b>	<b>152</b>
III-1. COMPARAISONS DE SEQUENCES .....	152
III-2. SELECTION DES SOUCHES TESTEES POUR LA RECHERCHE D'AUTO-INDUCTEURS .....	153
III-3. RECHERCHE D'AUTO-INDUCTEURS CHEZ <i>L. PNEUMOPHILA</i> .....	153
III-3.1. Principe .....	153
III-3.2. Recherche des AI-1 .....	155
III-3.2.1. Conditions de culture .....	155
III-3.2.2. Extraction des surnageants .....	155
III-3.2.3. Fractionnement HPLC .....	156
III-3.2.4. Test des fractions en présence des souches rapporteurs .....	157
III-3.2.4.a. Tests avec la souche rapporteur <i>C. violaceum</i> .....	157
III-3.2.4.b. Test avec la souche rapporteur <i>A. tumefaciens</i> .....	157
III-3.3. Recherche des AI-2 .....	157
III-3.3.1. Croissance des légionelles en bouillon nutritif .....	158
III-3.3.2. Croissance intra-amibienne des légionelles .....	158
III-3.3.3. Détection des AI-2 .....	159
III-3.4. Influence d'auto-inducteurs exogènes sur la multiplication intra-amibienne de <i>L. pneumophila</i> .....	159
III-3.4.1. Souche de <i>L. pneumophila</i> utilisée .....	159
III-3.4.2. Influence de l'incubation de <i>L. pneumophila</i> -GFP avec des AI-1 .....	160
III-3.4.3. Influence de l'incubation de <i>L. pneumophila</i> -GFP avec des AI-2 .....	161
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>162</b>
<b>1<sup>ère</sup> Partie : Suivi de la contamination d'un réseau intérieur .....</b>	<b>163</b>
I- MISE EN PLACE ET VALIDATION DE LA METHODE DE TYPAGE .....	164
II- SUIVI DE LA CONTAMINATION D'UN RESEAU INTERIEUR .....	166
II-1. METHODES CLASSIQUES DE SUIVI DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DE L'EAU ET DES BIOFILMS .....	166
II-1.1. Incubateur Eau Froide .....	166
II-1.1.1. Détection des légionelles .....	166
II-1.1.2. Paramètres physico-chimiques .....	168
II-1.2. Incubateur eau chaude .....	168
II-1.2.1. Détection des légionelles .....	168
II-1.2.2. Paramètres physico-chimiques .....	170
II-2. TYPAGE DES COLONIES ISOLEES .....	170
II-3. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE .....	171
II-3.1. Validation des sondes .....	171
II-3.2. Hybridations sur biofilms .....	172
II-3.2.1. Sonde EUB338 .....	173
II-3.2.2. Sonde LEGPNE1 .....	174
II-4. DISCUSSION .....	176
II-4.1. Comparaison des techniques de détection .....	176
II-4.1.1. Limite de détection .....	178
II-4.1.2. Impact du cycle de développement intra-cellulaire de <i>L. pneumophila</i> sur la détection en FISH ? .....	178
II-4.1.3. Traitement des biofilms et impact sur la détection .....	179
II-4.2. Intérêt des incubateurs à biofilms pour la détection de <i>L. pneumophila</i> par culture .....	

.....	180
II-4.2.1. Typage.....	180
II-4.2.2. Contamination du réseau .....	181
II-5. CONCLUSION .....	183
<b>III- REIMPLANTATION DE LA SOUCHE ISOLEE A PARTIR DES INCUBATEURS DANS DES BIOFILMS ARTIFICIELS .....</b>	<b>184</b>
III-1. COLONISATION PRELIMINAIRE DES COUPONS .....	184
III-2. SUIVI DE L'EVOLUTION DE LA FLORE APRES INOCULATION DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> .....	185
III-2.1. Dénombrements sur géloses .....	185
III-2.1.1. Flore hétérotrophe .....	185
III-2.1.2. <i>L. pneumophila</i> .....	186
III-2.2. FISH .....	188
III-3. DISCUSSION .....	188
III-4. CONCLUSION .....	190
<b>2<sup>ème</sup> Partie : Comparaison de l'efficacité des traitements de désinfection .....</b>	<b>191</b>
<b>I- CONTEXTE DE L'ETUDE.....</b>	<b>192</b>
<b>II- ESSAIS DE COLONISATION D'UNE CANALISATION.....</b>	<b>193</b>
II-1. COLONISATION NATURELLE .....	193
II-2. INOCULATION DU MELANGE DE SOUCHES DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> .....	193
II-3. CONCLUSION .....	194
<b>III- ESSAIS DE DESINFECTION SUR PILOTE .....</b>	<b>195</b>
III-1. COLONISATION .....	195
III-1.1. Caractéristiques physicochimiques de l'eau alimentant le pilote .....	195
III-1.2. Implantation et stabilisation de la population de <i>L. pneumophila</i> .....	195
III-1.3. Flore du pilote avant traitement.....	197
III-1.3.1. Evaluation par culture.....	197
III-1.3.2. Evaluation par marquage LIVE/DEAD.....	198
III-1.3.2.a. <i>Biofilms des boucles principales</i> .....	198
III-1.3.2.b. <i>Biofilms des bras morts</i> .....	199
III-1.3.3. Evaluation par marquage FISH .....	200
III-1.3.3.a. <i>Détermination du nombre de champs à analyser</i> .....	200
III-1.3.3.b. <i>Essais de dopage des biofilms</i> .....	200
III-1.3.3.c. <i>Composition des biofilms des boucles</i> .....	201
III-1.3.3.d. <i>Composition des biofilms des bras morts</i> .....	202
III-2. ETUDE DES EFFETS DES DIFFERENTS TRAITEMENTS DE DESINFECTION .....	204
III-2.1. Evaluation par culture.....	204
III-2.1.1. Boucles.....	204
III-2.1.1.a. <i>Flore planctonique</i> .....	204
III-2.1.1.b. <i>Biofilms</i> .....	205
III-2.1.2. Bras morts .....	209
III-2.2. Effet des traitements évalué par marquage LIVE/DEAD.....	213
III-2.2.1. Boucles .....	213
III-2.2.2. Bras morts .....	216
III-2.3. Effet des traitements évalué par marquage FISH .....	218
III-2.3.1. Boucles.....	218
III-2.3.2. Bras morts .....	219
III-3. RECOLONISATION APRES ARRET DES TRAITEMENTS .....	220
III-4. DISCUSSION .....	220
III-4.1. Traitements .....	220
III-4.1.1. Flore bactérienne.....	220
III-4.1.2. Amibes.....	223
III-4.2. Marquage LIVE/DEAD .....	225

III-4.3. Marquage FISH .....	228
III-4.4. Analyse d'images .....	230
III-5. CONCLUSION .....	230
<b>3<sup>ème</sup> Partie : Auto-inducteurs .....</b>	<b>232</b>
<i>I- CONTEXTE DE L'ETUDE</i> .....	233
<i>II- AUTO-INDUCTEURS DE TYPE 1</i> .....	233
II-1. SELECTION DES SOUCHES DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> TESTEES .....	233
II-2. MISE AU POINT DE LA METHODE D'EXTRACTION .....	234
II-2.1. Allure des chromatogrammes .....	234
II-2.2. Tests de détection des AHLs .....	236
II-2.2.1. Avec la souche rapporteur <i>C. violaceum</i> .....	236
II-2.2.2. Avec la souche rapporteur <i>A. tumefaciens</i> NTL4 .....	239
II-3. TEST DES SOUCHES DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> .....	239
<i>III- AUTO-INDUCTEURS DE TYPE 2</i> .....	240
III-1. CROISSANCE DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> EN MILIEU NUTRITIF .....	240
III-2. CROISSANCE DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> DANS LES AMIBES .....	240
<i>IV- INFLUENCE DES AUTO-INDUCTEURS EXOGENES SUR LA MULTIPLICATION</i> <i>INTRA-AMIBIENNE DE L. PNEUMOPHILA</i> .....	242
IV-1. INCUBATION AVEC LES AUTO-INDUCTEURS .....	242
IV-2. OBSERVATION DE LA CROISSANCE INTRA-AMIBIENNE .....	243
<i>V- DISCUSSION</i> .....	245
 <b>CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>247</b>
1 - Conclusions .....	249
1-a. Ecologie de <i>L. pneumophila</i> sur site .....	249
1-b. Essais de désinfection sur circuit pilote simulateur de réseau .....	249
1-c. Auto-inducteurs et <i>L. pneumophila</i> .....	250
2 - Perspectives .....	251
2-a. Ecologie de <i>L. pneumophila</i> sur site .....	251
2-b. Essais de désinfection sur pilote .....	252
2-c. Légionelles et auto-inducteurs .....	252
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>251</b>
 <b>ANNEXES .....</b>	<b>287</b>
I : Milieux de culture .....	288
II : Hybridation <i>in situ</i> Fluorescente .....	290
III : Méthodes d'isolement et de culture .....	293
IV : Alignements protéines Quorum-sensing .....	297
V : Publications .....	299

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont d'abord à Yves Lévi, qui m'a accueilli au sein de sa toute jeune équipe et qui a su m'accorder sa confiance, me laissant une grande liberté tout en m'assurant les moyens nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Cette thèse a été réalisée sous forme d'une Convention CIFRE, impliquant trois centres de recherche du groupe SUEZ : le Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement (C.I.R.S.E.E.) de SUEZ ENVIRONNEMENT (1), Cylergie, centre de recherche de la société Elyo (2), LABORELEC, centre de recherche de la société Tractebel (3), et la société Climespace, basée à Paris (4). Dans ce cadre, je remercie tout particulièrement Jean-François Loret (1), qui a largement participé à ce travail et qui a pris le temps de répondre à mes nombreuses sollicitations, ainsi que Samuel Robert et Carlos Campos (1), Françoise Martz et Nathalie Roussel (2), Lieve Verelst (3) et Michèle Merchat (4).

J'exprime par ailleurs ma profonde reconnaissance à M<sup>me</sup> Christine Roques et à M<sup>r</sup> Jérôme Etienne qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi qu'à M<sup>me</sup> Anne Collignon qui a accepté de faire partie du jury.

Les techniques de marquage, d'observation et d'analyse des populations des biofilms en fluorescence sont extrêmement fastidieuses, les réglages des paramètres d'acquisition du microscope confocal sont une véritable sinécure. Je tiens donc à signifier un immense merci à Théodore Bouchez, du groupement Cemagref d'Antony, qui m'a guidé tout au long de cette éprouvante mise au point. Valérie Nicolas (IFR75 – ISIT, Plateau Technique d'Imagerie de la Faculté de Pharmacie) a largement participé à l'acquisition des centaines d'images, qui ont ensuite été analysées grâce, entre autres, aux logiciels mis au point et modifiés à ma demande par Jérôme Mutterer (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg). Je les remercie tous les deux chaleureusement.

Au sein du laboratoire je tiens à remercier particulièrement Daniel Perdiz, qui m'a souvent prodigué des conseils éclairés et qui a pris le temps de corriger la publication soumise à "Journal of Applied Microbiology" malgré sa méconnaissance

du sujet. Mes remerciements vont aussi à tous les autres membres de l'équipe : Noureddine Bouaïcha, Annick Berkovic, Viviane Huteau, Sara Karolak et Tania Boyer qui ont tous participé à la réalisation de ce travail, que ce soit par leur contribution au maintien de l'infrastructure nécessaire (vaisselle, commandes, ...) ou par leurs conseils ponctuels dans des domaines qui ne m'étaient pas familiers (HPLC), ou bien encore par la confection régulière de plats appétissants et de boissons "énergisantes".

A la Faculté, j'ai également eu le plaisir de côtoyer Claudine Delomenie (IFR75 – ISIT, Plateau Technique d'Analyse du Transcriptome), avec qui j'ai essayé de mettre au point des techniques de détection par PCR quantitative qui n'ont malheureusement pas abouti mais qui sont actuellement en cours d'optimisation par mes successeurs. Je la remercie pour l'implication importante qu'elle a su prendre dans mes expériences, pour l'encadrement scientifique qu'elle m'a apporté et qu'elle continue d'apporter pour la réalisation de ces projets. Sylvie Bouttier (Laboratoire de Microbiologie Industrielle de la Faculté) a pris le temps d'accueillir un étudiant en DEA que je lui avais un peu "refilé", elle lui a enseigné les expérimentations qui ont ensuite constitué la majeure partie de son mémoire, je l'en remercie vivement.

Les souches rapporteurs utilisées pour la détection des auto-inducteurs et la souche fluorescente ayant permis de visualiser directement l'invasion des amibes par *L. pneumophila* m'ont été gracieusement fournies par D. Kirke (Département des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Nottingham, Angleterre), C. Fuqua (Département de Biologie de l'Université de l'Indiana, Etats-Unis), B. Bassler (Département de Biologie Moléculaire de l'Université de Princeton, Etats-Unis) et M. Steinert (Institut für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg, Allemagne). Je les remercie pour cette contribution désintéressée. J'associe à ces remerciements l'équipe de J. Etienne (Centre National de Référence des Légionelles, Lyon) qui nous a fourni la collection de souches de *L. pneumophila* et qui m'a accueilli pendant quelques jours afin que je me forme aux méthodes de typage moléculaire. J'adresse aussi un remerciement à tous les auteurs des publications dans lesquelles je me suis permis de piocher les nombreuses illustrations qui étayaient la partie bibliographique de ce mémoire.

Mes salutations vont aussi à tous ceux que j'ai pu côtoyé au laboratoire : Corinne, David, Asmaa, Lynda, Safia, Imed, Delphine, Estelle, Gaëlle, Sophie, Salma, Virginie, Bertrand, Aymeric, Romain, Marjorie, Maya et tout particulièrement Maëlle, condisciple avec qui je partageais le plus d'affinités et sans le soutien de qui ces quatre années auraient été beaucoup plus difficiles à négocier. En plus des étudiants en DEA qui ont pour la plupart su acquérir rapidement leur autonomie, j'ai été amené à encadrer deux étudiantes en maîtrise qui m'ont été "confiées" par Ghani Sghir (Genoscope, Evry) : Nouara et Betti. Elles m'ont permis de me rendre compte de la grande difficulté qu'il y a à enseigner et à former des néophytes, mais aussi de la grande satisfaction qu'il y a à les voir se passionner pour leur sujet, je les en remercie.

Enfin un grand merci à mes proches, ma famille et mes amis : mes parents qui m'ont soutenu pendant cette longue épopée parsemée de doutes et d'hésitations qu'auront été mes études, mes grands-parents pour qui j'ai une pensée affectueuse, mon frère et ma sœur qui heureusement se sont contentés de cursus d'une durée plus raisonnable. Finalement je remercie très tendrement Caroline, qui a plus que tous les autres partagé mon quotidien ces derniers mois, et qui a donc subi les affres du thésard obnubilé par la finalisation de sa publi, de son manuscrit et finalement de sa soutenance ... promis, je ne recommencerai plus !

\*\*\*\*\*



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- p. 29 Figure 1 : Schéma simplifié de l'appareil pulmonaire et des bronchioles
- p. 32 Figure 2 : Fonctions hypothétiques de certaines protéines du système Dot/Icm
- p. 34 Figure 3 : LPS de *L. pneumophila*
- p. 42 Figure 4 : Représentation schématique des cycles de croissance intra- et extra-cellulaire de *L. pneumophila*
- p. 46 Figure 5 : Aspect en coloration de Gimenez de différentes espèces de légionelles après 24 h de multiplication dans les cellules Vero
- p. 50 Figure 6 : Encart publicitaire pour un "Piège à légionelles"
- p. 87 Figure 7 : Schéma de principe de la théorie de l'origine endosymbiotique de la vie
- p. 92 Figure 8 : Ancienne et nouvelle classification des *Chlamydiales*
- p. 101 Figure 9 : Structures cellulaires conditionnant les premières étapes de l'adhésion
- p. 106 Figure 10 : Constitution et maturation du biofilm
- p. 107 Figure 11 : Biofilm constitué d'une souche de *P. aeruginosa* mobile (jaune) et d'une souche mutante ayant perdu sa mobilité (bleue)
- p. 116 Figure 12 : Biosynthèse des homosérines lactones et des auto-inducteurs de type 2
- p. 119 Figure 13 : Structure des auto-inducteurs de type 1
- p. 120 Figure 14 : Schéma du système de régulation LuxI/LuxR
- p. 121 Figure 15 : Modèle du système de contrôle par quorum-sensing chez *P. aeruginosa*
- p. 122 Figure 16 : Coexistence et interaction des systèmes AI-1 et AI-2 chez *V. harveyi*
- p. 128 Figure 17 : Vue générale de l'incubateur à biofilms et vue agrandie d'une cartouche
- p. 129 Figure 18 : Implantation des incubateurs dans le réseau d'eau chaude sanitaire
- p. 135 Figure 19 : coupon de silicone monté sur le bouchon silicone poreux lui-même inséré dans le capuchon d'un flacon pour prélèvement automatique
- p. 140 Figure 20 : photographies du pilote reproduisant un réseau interne
- p. 141 Figure 21 : schéma du pilote reproduisant un réseau interne
- p. 150 Figure 22 : Procédure d'analyse informatique des images obtenues par marquage LIVE/DEAD des biofilms
- p. 151 Figure 23 : Procédure d'analyse informatique des images obtenues par marquage des populations des biofilms avec les sondes ARNr
- p. 160 Figure 24 : Représentation de la construction plasmidique introduite dans la souche *L. pneumophila* JR32
- p. 165 Figure 25 : Profils AP-PCR des souches de *L. pneumophila* séro-groupe 1 fournies par le Centre National de Référence.

- 
- p. 166 Figure 26 : Dendrogramme et représentation schématique des profils AP-PCR B1245 des souches de *L. pneumophila*
- p. 167 Figure 27 : Résultats des dénombrements des légionelles dans l'eau et les biofilms par méthode AFNOR, et des analyses physico-chimiques réalisées sur l'eau froide
- p. 169 Figure 28 : Résultats des dénombrements des légionelles dans l'eau et les biofilms par méthode AFNOR, et des analyses physico-chimiques réalisés sur l'eau chaude
- p. 171 Figure 29 : Détection et comptage en cytométrie en flux d'une culture pure de *L. pneumophila* (souche réseau) après hybridation avec les sondes Non338 (témoin négatif), EUB338 (Témoin positif) et LEGPNE1 (sonde spécifique)
- p. 173 Figure 30 : Aspect des biofilms hybridés avec la sonde EUB338
- p. 174 Figure 31 : Aspects des biofilms hybridés à partir de J88
- p. 175 Figure 32 : Aspect des biofilms provenant du réseau d'eau chaude hybridés avec la sonde LEGPNE1
- p. 176 Figure 33 : Signal positif obtenu après hybridation du biofilm eau froide prélevé à J27 avec la sonde LEGPNE1
- p. 177 Figure 34 : Montage réalisé à partir des images présentées dans les travaux de Williams *et al.* 2003
- p. 184 Figure 35 : Aspect des biofilms sur coupons de silicone observés en microscopie confocale après coloration syto-9 juste avant l'inoculation de *L. pneumophila*
- p. 185 Figure 36 : Evolution des dénombrements sur R2A à partir de la phase planctonique et des biofilms prélevés à 48, 168, 336 et 528 h après inoculation de *L. pneumophila*
- p. 186 Figure 37 : Evolution des quantités de *L. pneumophila* dénombrées sur GVPC à partir de la phase planctonique et des biofilms prélevés à 48, 168, 336 et 528 h après inoculation
- p. 188 Figure 38 : Hybridation du biofilm *B. vesicularis* + *L. pneumophila* après 48 h d'incubation
- p. 194 Figure 39 : Evolution des proportions des différentes souches isolées dans l'eau en sortie de canalisation
- p. 197 Figure 40 : Etat de la colonisation du pilote (boucles principales) cinq semaines après la mise en eau
- p. 198 Figure 41 : Contamination du pilote 12 jours avant le début des traitements
- p. 199 Figure 42 : Aspect des biofilms sur coupons PVC en marquage LIVE/DEAD avant démarrage des traitements.
- p. 200 Figure 43 : Evolution de la moyenne et des écarts-types des proportions d'aires spécifiques à la sonde d'intérêt BET42a en fonction du nombre de champs analysés
- p. 201 Figure 44 : Biofilm issu de la boucle A (avant traitement), dopé en *L. pneumophila* souche "pilote" et hybridé avec la sonde LEG705

- p. 203 Figure 45 : Exemples de champs observés après hybridation des biofilms issus de la boucle témoin
- p. 206 Figure 46 : Effet des traitements sur la flore hétérotrophe, *L. pneumophila* et les amibes dans l'eau et les biofilms des boucles principales
- p. 208 Figure 47 : Evolution des dénombrements de *L. pneumophila* réalisés dans l'eau des boucles pendant toute la durée de l'étude
- p. 210 Figure 48 : Effet des traitements sur la flore hétérotrophe, *L. pneumophila* et les amibes dans l'eau et les biofilms des bras morts
- p. 212 Figure 49 : Evolution des dénombrements de *L. pneumophila* réalisés dans l'eau des bras morts pendant toute la durée de l'étude
- p. 214 Figure 50 : Biomasse totale et proportion des biomasses marquée par le syto-9 (vivant) et l'IP (mort) déterminées par marquage LIVE/DEAD et analyse d'images
- p. 215 Figure 51 : Différents aspects des biofilms issus des boucles et marqués au LIVE/DEAD pendant l'étude
- p. 217 Figure 52 : Différents aspects des biofilms issus des bras morts et marqués au LIVE/DEAD pendant l'étude
- p. 219 Figure 53 : Hybridation avec MixEUB338 des biofilms issus des boucles traitées à l'ozone et au cuivre-argent, après 6 jours de traitement
- p. 225 Figure 54 : Marquage LIVE/DEAD d'un coupon PVC prélevé sur un bras mort et incubé 12 heures à 37°C dans du R2A dilué au 1/10 dans de l'eau du robinet stérilisée par filtration
- p. 226 Figure 55 : droites de corrélation entre la quantité de biomasse vivante sur les coupons PVC déterminée par analyse d'images, et les dénombrements sur gélose R2A à partir des biofilms prélevés sur billes de verre
- p. 234 Figure 56 : courbes de croissance des différentes souches cultivées en bouillon BCYE
- p. 235 Figure 57 : Allure des chromatogrammes obtenus par injection et élution du solvant seul ou du solvant additionné d'AHL (A), des extraits des différents surnageants de culture sur cartouche C18 (B) et DVB (C) en série
- p. 237 Figure 58 : Résultats des tests d'activation de la synthèse de violacéine par *C. violaceum* 026 en présence des différentes fractions HPLC des extraits témoins
- p. 238 Figure 59 : Résultats des tests d'activation de la  $\beta$ -galactosidase de *A. tumefaciens* NTL4 en présence des différentes fractions HPLC
- p. 240 Figure 60 : Evolution des rapports des luminescences de *V. harveyi* BB170 induites par les surnageants de culture de *V. harveyi* BB120 et BB152 par rapport à celle induite par le milieu de culture stérile AB, et par le surnageant de culture de la souche

- L. pneumophila* Paris cultivée en bouillon BCYE (J10) par rapport au bouillon BCYE stérile
- p. 241 Figure 61 : Suivi de la croissance de *L. pneumophila* souche Paris dans *A. castellanii* ATCC30010
- p. 242 Figure 62 : Effet de l'incubation *L. pneumophila* JR 32 (pBC(*gfp*)-*Pmip*) avec 50  $\mu$ M d'AI-1 ou du surnageant de culture de la souche *Vibrio harveyi* BB152 (AI-2) sur l'infectivité vis-à-vis des amibes et la croissance intra-amibienne
- p. 244 Figure 63 : Différentes étapes de la croissance intra-amibienne de *L. pneumophila* JR 32 (pBC(*gfp*)-*Pmip*) observées en microscopie à épifluorescence
- p. 26 Tableau I : Espèces et sérogroupes du genre *Legionella*
- p. 30 Tableau II : Lignées cellulaires d'origine mammifère supportant la multiplication de *L. pneumophila*
- p. 32 Tableau III : Correspondances des systèmes Dot/Icm et gènes homologues du plasmide R64
- p. 63 Tableau IV : Interactions connues des légionelles avec d'autres espèces procaryotes
- p. 67 Tableau V : Interactions connues des légionelles avec des espèces eucaryotes
- p. 89 Tableau VI : Micro-organismes capables de survivre et / ou de se multiplier à l'intérieur d'amibes libres
- p. 117 Tableau VII : Homologues LuxR/LuxI, AI-1 synthétisés et phénotype régulé chez un certain nombre d'espèces bactériennes
- p.118 Tableau VIII : Phénotype et gènes régulés par *luxS* (AI-2) chez un certain nombre d'espèces bactériennes
- p. 147 Tableau IX : Liste des sondes utilisées
- p. 168 Tableau X : Moyennes et écart-types sur toute la durée de l'étude des paramètres physico-chimiques relevés en eau froide et en eau chaude
- p. 172 Tableau XI : résultats semi-quantitatifs observés après hybridation des biofilms prélevés en eau chaude et en eau froide avec la sonde universelle EUB338 ou la sonde spécifique LEGPNE1 et contre marquage syto-9
- p. 195 Tableau XII : caractéristiques physico-chimiques de l'eau alimentant le pilote
- p. 202 Tableau XIII : Composition des biofilms à J-12 avant traitement déterminée par hybridation avec les sondes de groupe et analyse d'images
- p. 218 Tableau XIV : Composition des biofilms des boucles à J6 après traitement déterminée par hybridation avec les sondes de groupe et analyse d'images
- p. 220 Tableau XV : Composition des biofilms des bras morts à J51 après traitement déterminée par hybridation avec les sondes de groupe et analyse d'images

## LISTE DES ABREVIATIONS

µg	microgramme
µm	micromètre
µM	micromolaire
ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNt	ADN de transfert
ADP	adénosine diphosphate
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AFNOR	Association Française de Normalisation
AHL	Acyl Homosérine Lactone
AI-1	auto-inducteurs de type 1
AI-2	auto-inducteurs de type 2
AOB	Ammoniac oxydizing bacteria
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
ARF	ADP-ribosylation factor
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ATCC	American type culture collection
ATP	adénosine triphosphate
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BET	bromure d'éthidium
CIP	collection Institut Pasteur
CIRSEE	Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement
COA	carbone organique assimilable
CODB	carbone organique dissous biodégradable
COT	carbone organique total
CsrA	carbon storage regulator A
Ct	concentration de désinfectant en mg/L / temps de contact en minutes)

---

Cy3	tris-indocyanine
Cy5	penta-indocyanine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Dot	Defective in Organelle Trafficking
DPD	4,5-dihydroxy 2,3-pentanedione
DVB	divinylbenzène
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPA	Environmental Protection Agency
EPM	exopolymères
EPS	exopolysaccharides
EtOH	ethanol
EWGLI	European Working Group for Legionella Infections
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
GDP	Guanosine di-phosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosine tri-phosphate
GVPC	BCYE + glycine vancomycine polymixine B et cycloheximide
HPLC	High pressure liquid chromatography
Icm	Intra-Cellular Multiplication
IP	iodure de propidium
IRS-PCR	Infrequent Restriction Site PCR
Kb	kilobase
LB	Lutteriani broth
Log	logarithme en base 10
Lp	<i>L. pneumophila</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	lipoteichoic acid
mA	milli-ampère
MAb	monoclonal antibody
MeOH	methanol
mg	milligramme
MIFs	Mature Intracellular Forms
min	minute

Mip	Macrophage Infectivity Potentiator
mL	millilitre
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MTA	méthylthioadénosine
MTR	méthylthioribose
ng	nanogramme
nm	nanomètre
NNA	non nutriment agar
NPP	nombre le plus probable
<i>P</i>	probabilité
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chained reaction
PFA	paraformaldéhyde
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PHB	polyhydroxybutyrate
PVC	polyvinyle chloré
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SAH	S-adénosylhomocystéine
SAM	S-adénosylméthionine
SDS	sodium dodécyl sulfate
SRH	S-ribosylhomocystéine
TE	Tris-EDTA
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism
Tris	tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
UFC	unité formant colonie
UNBCYE	BCYE sans L-cystéine
UV	ultraviolet
VNTRs	variable-number tandem repeats
XGal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-L-D-galactopyranoside

# CHAPITRE I

## Introduction



## INTRODUCTION GENERALE

En janvier 1977, Joseph McDade du « Center for Disease Control » (CDC) découvre une nouvelle espèce bactérienne lors de ses travaux portant sur l'épidémie de pneumonies inexplicables ayant frappé les participants à un congrès de l'American Legion à Philadelphie en 1976 (Brenner 1987). Parmi les quelques milliers de participants au congrès, 221 furent atteints de pneumonie, d'issue fatale pour 34 patients. La bactérie responsable de cette épidémie largement médiatisée à l'époque a été isolée à partir des poumons de l'un des patients décédés (Anonymous 1997). Elle fût nommée *Legionella* en référence aux légionnaires victimes de cette première épidémie et *pneumophila* en référence à son site d'infection privilégié. La source de contamination était le système de climatisation de l'hôtel accueillant les congressistes. Suite à l'identification de cette nouvelle espèce bactérienne pathogène, des recherches portant sur des épidémies ou des cas isolés de pneumonies inexplicables furent menées. La transmission à l'homme se fait essentiellement via l'inhalation ou l'aspiration d'aérosols contaminés (Brieland *et al.* 1997) qui peuvent être générés par différents types de dispositifs alimentés par les réseaux d'eau potable : robinets, pommeaux de douches, tours aéro-réfrigérantes, nébuliseurs (Atlas 1999), ...

La connaissance du cycle de *L. pneumophila* aussi bien à l'état libre dans l'environnement que chez les différents hôtes qu'elle parasite afin de se multiplier a beaucoup progressé. La bactérie peut demeurer à l'état viable non cultivable dans des eaux naturelles de qualités variées et pendant des durées importantes (Palmer *et al.* 1993). L'ingestion de ces formes dormantes par des amibes provoquera leur ressuscitation, suivie d'une multiplication intra-amibienne aboutissant à la libération de plusieurs centaines de nouvelles bactéries (Steinert *et al.* 1997). Par ailleurs *L. pneumophila* peut survivre dans des kystes amibiens hautement résistants aux traitements de désinfection utilisés pour la potabilisation de l'eau (Kilvington *et al.* 1990), elle est donc particulièrement récalcitrante à tout traitement chimique et capable de coloniser la plupart des réseaux de distribution. L'intérêt suscité par ce mode de propagation s'est vu renforcé ces dernières années par la mise en évidence

d'autres espèces bactériennes pathogènes présentant une écologie proche, elles aussi susceptibles d'infecter l'homme. La problématique des relations amibes / bactéries / Homme pourrait donc être étendue à de nombreuses autres espèces dans les prochaines années (Wyniecka-Krusnell *et al.* 2001).

Les interactions de *L. pneumophila* avec la flore bactérienne et les amibes ont lieu au niveau des biofilms présents à la surface interne des canalisations des réseaux de distribution d'eau potable. Le développement de ces communautés de micro-organismes fixés et inclus dans une matrice extra-cellulaire est régi par de nombreux mécanismes. Certains de ces mécanismes proviennent de la communauté microbienne elle-même : interactions métaboliques, transferts de gènes, sécrétion de signaux cellulaires interagissant entre les différentes espèces, ... D'autres mécanismes font intervenir des éléments extérieurs : apports de nutriments, paramètres physico-chimiques, traitements de désinfection, ... A l'intérieur de ces communautés *L. pneumophila* mène une "vie sociale complexe" (Fields 2002). Elle interagit avec les autres espèces bactériennes du biofilm, certains auteurs suggèrent qu'elle pourrait trouver les nutriments nécessaires à sa croissance et se développer en l'absence d'hôte procaryote (Surman *et al.* 2002). Par ailleurs les biofilms constituent de véritables réservoirs à l'intérieur desquels les bactéries sont protégées de l'action des traitements de désinfection (Cochran *et al.* 2000). Ils permettent la recolonisation rapide de l'eau circulante à la moindre défaillance de ces traitements. Cette résistance accrue est le résultat de plusieurs mécanismes : pénétration limitée des molécules, phénotype particulier des bactéries, instabilité des produits utilisés, ...

Notre étude a été initiée afin de mieux comprendre l'écologie de *L. pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable. Elle résulte d'une convention CIFRE signée entre l'Equipe d'Accueil EA3542 Santé Publique Environnement de la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud 11, trois centres de recherche du groupe SUEZ: le Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement (C.I.R.S.E.E.) de SUEZ ENVIRONNEMENT, situé au Pecq (78), Cylergie, centre de recherche de la société Elyo, basé à Ecully (69), LABORELEC, centre de recherche de la société Tractebel, situé près de Bruxelles (Belgique), et la société Climespace, basée à Paris.

Notre travail expérimental est organisé en trois parties dont l'ambition est de répondre à trois types d'attentes différentes :

- Première partie : suivi de la colonisation d'un réseau intérieur par *L. pneumophila*

Le but de cette première série de travaux est de comparer deux techniques de détection des légionelles dans les biofilms des réseaux de distribution d'eau potable. En effet il semblerait qu'étant donné l'écologie particulière de *L. pneumophila*, les moyens de détection par culture à partir de prélèvements d'eau ne soient pas les plus efficaces en termes de rapidité et de sensibilité. Les techniques d'hybridation avec des sondes fluorescentes spécifiques sont aujourd'hui largement décrites dans la littérature. Elles sont rapides, relativement simples à mettre en œuvre et l'intensité du signal obtenu est fonction de l'activité métabolique, donc de la viabilité des bactéries ciblées. Ces méthodes pourraient donc répondre aux attentes des exploitants pour qui une réponse rapide et adaptée à la contamination est cruciale. Afin de comparer ces deux techniques nous avons suivi l'évolution de la contamination en légionelles d'un réseau intérieur sur une durée de 12 mois. Nous avons sélectionné un site représentatif pour y installer deux "incubateurs à biofilms" consistant en neuf cartouches remplies de billes de verre, l'un sur le réseau d'eau froide et l'autre sur le réseau d'eau chaude. Un certain nombre d'analyses ont par la suite été conduites régulièrement, d'abord toutes les deux semaines puis tous les mois, afin de suivre l'évolution de la contamination en légionelles de l'eau et des biofilms. Nous avons utilisé la méthode de culture classique (norme AFNOR), ainsi que la technique FISH pour la détection des bactéries. Les colonies isolées sur géloses ont été typées par AP-PCR afin de suivre l'évolution des souches présentes et un certain nombre de paramètres physico-chimiques ont été relevés.

- Seconde partie : évaluation de l'efficacité des traitements de désinfection sur *L. pneumophila*, les amibes et les biofilms

Un grand nombre de traitements sont aujourd'hui disponibles pour empêcher la prolifération des micro-organismes dans les réseaux d'eau potable. La plupart des études portant sur l'efficacité de ces traitements se limitent à l'évaluation

d'une seule méthode, et la variabilité des paramètres physico-chimiques rend difficile les comparaisons inter-études. Dans cette deuxième partie expérimentale nous utilisons un pilote mis au point par l'équipe du CIRSEE afin de pouvoir tester et comparer dans des conditions identiques les traitements de désinfection couramment utilisés pour l'eau potable : chlore, monochloramine, dioxyde de chlore, ozone et ionisation cuivre / argent. L'efficacité de ces traitements contre la flore totale, les légionelles et les amibes dans l'eau aussi bien que dans les biofilms est évaluée grâce à différentes méthodes : culture et méthodes moléculaires. Dans le but de suivre l'évolution des biofilms durant les traitements nous avons utilisé deux types de marquages fluorescents : marquage de vitalité sur biofilms entiers, et marquages à l'aide de sondes ciblant l'ARNr afin d'identifier et de quantifier les groupes bactériens au sein de biofilms détachés. Les images acquises après ces différents types de marquages ont été analysées à l'aide de logiciels informatiques spécialisés. Les résultats obtenus durant cette campagne d'analyses ont permis de mieux appréhender l'action des traitements sur les biofilms et ont donné lieu à la rédaction de deux articles soumis pour publication dans "Journal of Applied Microbiology" et "Journal of Water and Health" (Annexe V, publications n° 2 & 3).

- Troisième partie : recherche d'auto-inducteurs sécrétés par *L. pneumophila*

Ces dernières années, l'importance de signaux de communication inter-cellulaires dans de nombreux processus écologiques a été mise en évidence : formation des biofilms, expression de la virulence, ... sont contrôlées par ces signaux chez de nombreuses espèces bactériennes. Des alignements de séquences réalisés avec le génome en cours de séquençage de *L. pneumophila* permettent d'envisager l'existence de tels systèmes de régulation chez cette espèce. Nous avons donc mis au point et adapté des techniques d'extraction et de purification des auto-inducteurs, afin de les utiliser sur plusieurs souches de *L. pneumophila*. Les légionelles ont été cultivées dans différentes conditions afin de tenir compte de l'impact que peut avoir la composition des milieux sur la sécrétion de ces molécules. Par ailleurs il a été rapporté récemment la modulation de l'expression de gènes par des AI-1 et des AI-2 chez des cellules eucaryotes. Dans les réseaux de distribution, les amibes se nourrissent en broutant le biofilm,

dans lequel les bactéries sécrètent des auto-inducteurs. Elles sont donc à proximité de ces auto-inducteurs, et susceptibles d'y être sensibles. Afin de mettre en évidence une éventuelle modulation de la cinétique d'invasion des amibes par *L. pneumophila* lors de telles expositions, nous avons incubé des légionelles et / ou des amibes avec ces molécules avant de réaliser des tests d'invasion et de croissance intra-amibienne.

\*\*\*\*\*

## **I – LEGIONELLA PNEUMOPHILA : POINT SUR LES CONNAISSANCES**

### **I-1. BIOLOGIE**

#### **I-1.1. Taxonomie**

Le sous-groupe de la famille des *Legionellaceae*, appartient à la sous-division gamma-2 des protéobactéries, il ne comprend qu'un genre : *Legionella*. Deux autres genres ont été proposés : *Fluoribacter* pour les espèces fluorescentes telles que *L. bozemanii* et *Tatlockia* pour l'espèce *L. micdadei*, mais les études récentes portant sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S ont confirmé que la famille *Legionellaceae* ne comprend qu'un seul phylum (Fields *et al.* 2002). L'espèce la plus proche phylogénétiquement des *Legionellaceae* est *Coxiella burnetii*, l'agent de la fièvre Q (zoonose d'origine animale), qui présente des caractéristiques communes avec *Legionella pneumophila* (Sturgill-Koszycki *et al.* 2000; La Scola *et al.* 2001a; Zusman *et al.* 2003). Depuis la caractérisation de *L. pneumophila* en 1977 par Shepard et McDade (CDC, Atlanta), 48 nouvelles espèces ont été décrites, dont 20 ont été impliquées dans des pathologies infectieuses (Tab. I). Cinq sont des pathogènes amibiens "Legionella-like" qui ne peuvent pas être cultivés sur milieux synthétiques, et ne peuvent être isolés que par coculture amibienne (Rowbotham 1993). L'espèce *L. pneumophila* comprend 15 sérogroupes, les espèces *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleii*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra*, et *L. quinlivanii* en comprennent 2 et les autres espèces un seul. L'identification des *Legionellae* se fait après croissance sur milieu "Buffered Charcoal Yeast Extract", avec confirmation par l'absence de croissance de la souche repiquée sur BCYE sans L-cystéine car toutes les espèces sauf *L. oakridgensis* et *L. spiritensis* sont auxotrophes pour cet acide aminé. Trois sous-espèces ont été décrites pour *Legionella pneumophila* : *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, *L. pneumophila* subsp. *fraseri*, et *L. pneumophila* subsp. *pascullei* (Brenner *et al.* 1988).

Tableau I : Espèces et sérogroupes du genre *Legionella*<sup>a</sup> (Fields et al. 2002)

Espèce	Nbre de sérogroupes	Nbre de sérogroupes impliqués dans une infection
1. <i>L. pneumophila</i>	15	15
2. <i>L. bozemanii</i>	2	2
3. <i>L. dumoffii</i>	1	1
4. <i>L. micdadei</i>	1	1
5. <i>L. longbeachae</i>	2	2
6. <i>L. jordanis</i>	1	1
7. <i>L. wadsworthii</i>	1	1
8. <i>L. hackeliae</i>	2	2
9. <i>L. feeleii</i>	2	2
10. <i>L. maceachernii</i>	1	1
11. <i>L. birminghamensis</i>	1	1
12. <i>L. cincinnatiensis</i>	1	1
13. <i>L. gormanii</i>	1	1
14. <i>L. sainthelensi</i>	2	2
15. <i>L. tucsonensis</i>	1	1
16. <i>L. anisa</i>	1	1
17. <i>L. lansingensis</i>	1	1
18. <i>L. erythra</i>	2	1 <sup>b</sup>
19. <i>L. parisiensis</i>	1	1
20. <i>L. oakridgensis</i>	1	1
21. <i>L. spiritensis</i>	1	0
22. <i>L. jamestowniensis</i>	1	0
23. <i>L. santicrucis</i>	1	0
24. <i>L. cherrii</i>	1	0
25. <i>L. steigerwaltii</i>	1	0
26. <i>L. rubrilucens</i>	1	0
27. <i>L. israelensis</i>	1	0
28. <i>L. quinlivanii</i>	2	0
29. <i>L. brunensis</i>	1	0
30. <i>L. moravica</i>	1	0
31. <i>L. gratiana</i>	1	0
32. <i>L. adelaidensis</i>	1	0
33. <i>L. fairfieldensis</i>	1	0
34. <i>L. shakespearei</i>	1	0
35. <i>L. waltersii</i>	1	0
36. <i>L. genomospecies</i>	1	0
37. <i>L. quateirensis</i>	1	0
38. <i>L. worsleiensis</i>	1	0
39. <i>L. geestiana</i>	1	0
40. <i>L. natarum</i>	1	0
41. <i>L. londoniensis</i>	1	0
42. <i>L. taurinensis</i>	1	0
43. <i>L. lytica</i>	1	0
44. <i>L. drozanskii</i>	1	0
45. <i>L. rowbothamii</i>	1	0
46. <i>L. fallonii</i>	1	0
47. <i>L. gresilensis</i>	1	0
48. <i>L. beliardensis</i>	1	0

<sup>a</sup>Les espèces sont présentées dans l'ordre chronologique de leur date d'isolement ou d'identification

<sup>b</sup>Le séro groupe 2 de *L. erythra* a été isolé chez l'Homme

### I-1.2. Caractères biologiques

Les légionelles sont des bacilles Gram négatif (coloration peu marquée), aérobies, non sporulés et non capsulés. Leurs dimensions varient entre 0,5 à 1 µm de largeur et 2 à 20 µm de longueur (Winn 1988). Elles sont mobiles, à l'exception de *L. oakridgensis*, *L. nautarum* et *L. londiniensis*, grâce à un flagelle la plupart du temps unique, en position polaire ou subpolaire (Ott *et al.* 1991). Elles sont chimio-organotrophes, utilisent des acides aminés comme sources d'énergie et de carbone. Leur paroi est très particulière par rapport à celle des autres bactéries Gram négatif : riche en acides gras ramifiés qui sont habituellement retrouvés chez les bacilles Gram positif, elle est aussi très hydrophobe (Miller 1983). Les ubiquinones de la membrane cytoplasmique sont elles aussi particulières par la présence de chaînes latérales isoprénoïdes comprenant plus de 10 unités isoprènes. Les sucres ne sont ni fermentés ni oxydés. Les légionelles sont incapables de réduire les nitrates, sont uréase -, catalase et gélatinase + pour la majorité. *L. pneumophila* présente la particularité par rapport aux autres espèces d'être capable d'hydrolyser l'hippurate.

### I-1.3. Epidémiologie

Aux Etats-Unis le nombre de personnes hospitalisées chaque année à cause d'une légionellose est estimé entre 8 000 et 18 000 (Marston *et al.* 1997). En France comme en Europe, le nombre de cas déclarés augmente d'année en année : 1 021 cas ont été déclarés en France en 2002 contre 807 et 610 en 2001 et 2000. Cette augmentation est notamment due à un renforcement de la surveillance depuis 1997 (Campese *et al.* 2003). L'incidence globale calculée serait de 7 cas pour 100 000 habitants, soit environ 10 fois plus que le nombre de cas rapportés (Botzenhart *et al.* 2002). La contamination se fait par inhalation d'aérosols contaminés et/ou aspiration de gouttelettes chargées de bactéries. La contamination inter-humaine n'a jamais pu être mise en évidence. Une étude internationale datant de 2002, portant sur 508 isolats cliniques provenant de patients atteints de légionellose d'origine communautaire, a permis d'identifier *L. pneumophila* dans 91,5% des cas, dont 84,2% de sérotype 1. Les autres espèces retrouvées étaient *L. longbeachae* (3,9%) et *L. bozemanii* (2,4%), suivies de *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L.*



*wadsworthii*, et *L. anisa* (2,2% en tout). *L. longbeachae* constituait 30,4% des isolats provenant d'Australie et de Nouvelle Zélande (Yu *et al.* 2002). Cette prévalence de *L. pneumophila* séro groupe 1 en clinique n'est pas retrouvée dans l'environnement : en France, elles ne représentent que 30% des souches environnementales (Doléans *et al.* 2003). Une virulence plus élevée liée au séro groupe 1 pourrait expliquer l'importance de ces souches en clinique. Le taux d'attaque de la légionellose est faible : environ 1%. Il s'agit d'une maladie opportuniste qui frappe la plupart du temps des personnes présentant déjà un certain nombre de facteurs de risque : tabagisme, éthyliisme, immunodépression, maladie sous-jacente, ... Le sexe masculin et un âge supérieur à 50 ans sont aussi des facteurs de risque. Le taux d'attaque de la fièvre de Pontiac, forme bénigne de l'infection, est beaucoup plus élevé : 95%, mais les bactéries n'ont jamais été isolées à partir de patients présentant une séroconversion ce qui laisse penser que la maladie serait due à une toxine ou à une forte réponse immunitaire vis-à-vis de la légionelle (Rowbotham 1980a). Bien que l'infection expérimentale de nombreux animaux soit possible, un seul cas d'infection accidentelle a été rapporté chez du bétail (Fabbi *et al.* 1998).

#### **I-1.4. Physiopathologie et clinique**

Les particules infectieuses de taille inférieure à 8 µm parviennent jusqu'aux alvéoles pulmonaires, elles peuvent être constituées de légionelles libres, de vésicules amibiennes remplies de légionelles (Berk *et al.* 1998) ou encore d'amibes contaminées (Brieland *et al.* 1997a; Brieland *et al.* 1997b). L'épithélium des alvéoles est constitué en majorité de cellules de type 1 qui couvrent 90% de la surface alvéolaire et interviennent dans les échanges gazeux. Elles forment une barrière de protection pour les capillaires (Fig. 1). Ce sont ces cellules ainsi que les macrophages alvéolaires qui sont la cible de l'invasion par *L. pneumophila* (Gao *et al.* 1999a; Alli *et al.* 2000).

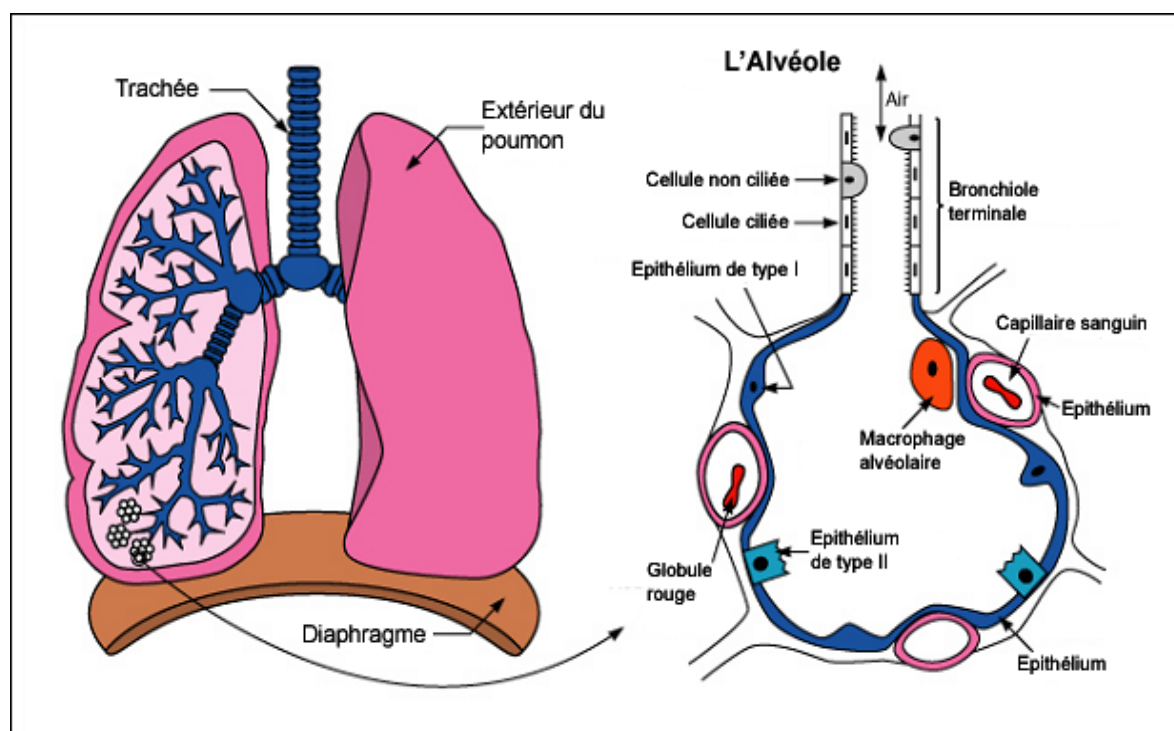


Figure 1 : Schéma simplifié de l'appareil pulmonaire et des bronchioles

La période d'incubation dure de 2 à 10 jours, suivie de l'apparition d'un syndrome pseudo-grippal avec fièvre, toux sèche, céphalées, myalgie et anorexie. La fièvre devient élevée, accompagnée d'une dyspnée et d'une toux importante et éventuellement d'expectorations purulentes. Des troubles digestifs et neurologiques tels que délire, confusion peuvent être retrouvés. Les deux complications majeures sont une insuffisance respiratoire irréversible accompagnée d'une insuffisance rénale aiguë. Les manifestations systémiques avec défaillance multi-viscérale sont souvent observées (Meyer 1983). La dose infectieuse n'est pas connue et dépend de l'état immunitaire du patient. Le taux de mortalité varie de 15 à 20% (Marston *et al.* 1994). Le traitement antibiotique fait appel aux macrolides et aux fluoroquinolones (Kac *et al.* 2002). Même après guérison, des lésions pulmonaires persistent. Elles seraient dues à l'action de la lysophospholipase A qui dégrade le phosphatidylglycerol et la phosphatidylcholine, constituants du surfactant pulmonaire, en lysophosphatidylcholine hémolytique à l'origine du syndrome de détresse respiratoire aiguë et de l'inflammation (Flieger *et al.* 2002). Les enfants en bas âge sont rarement infectés, les cas rapportés concernent des nouveau-nés de mères ayant accouché dans des piscines contaminées (Franzin *et al.* 2001; Nagai *et al.* 2003b). La réponse

immunitaire efficace est essentiellement cellulaire : ce sont les macrophages alvéolaires pulmonaires activés par des cytokines qui contrôlent l'infection (Deng *et al.* 2001; Matsunaga *et al.* 2001). L'interféron gamma semble jouer un rôle majeur; en cas de déficience la production de cytokines inflammatoires permettrait la croissance bactérienne avec pour conséquence une pneumonie fulminante (Shinozawa *et al.* 2002).

Des infections extrapulmonaires seules ou associées à une pneumonie ont été observées : atteintes cardiaques (Camara Gonzalez *et al.* 1993), digestives (Leluc *et al.* 2000), arthritiques (Bemer *et al.* 2002), rénales (Allen *et al.* 1985), encéphalites (Karim *et al.* 2002), ...

### I-1.5. Facteurs de virulence de *Legionella pneumophila*

De nombreuses lignées cellulaires, d'origine humaine ou non, permettent la multiplication des légionelles (Tab. II) et ont donc permis d'étudier l'expression de facteurs de virulence lors de l'infection.

**Tableau II : Lignées cellulaires d'origine mammifère supportant la multiplication de *L. pneumophila* (Fields 1996)**

Cellule	Origine	Espèce
CHO	Fibroblaste ovarien	Hamster chinois
H9	Lymphocyte T sanguin	Homme
HL60	Promyeloocyte sanguin	Homme
Hela	Cellule épithéliale cervicale	Homme
HEp-2	Cellule épithéliale de larynx	Homme
JEG-3	Cellule épithéliale choriocarcinomique	Homme
L929	Fibroblaste conjonctif	Souris
McCoy	Fibroblaste	Souris
MRC-5	Fibroblaste de poumon foetal	Homme
RAW 264.7	Monocyte	Souris
THP 1	Monocyte sanguin	Homme
U937	Lymphocyte, effusion pleurale	Homme
VERO	Fibroblaste de rein	Singe africain
WI 26 VA4	Cellule épithéliale pulmonaire	Homme

## I-1.5.1 Le système Dot/Icm

Les groupes de gènes *dot* (Defective in Organelle Trafficking) et/ou *icm* (Intra-Cellular Multiplication), situés sur deux régions distinctes du chromosome bactérien, ont été identifiés indépendamment par deux équipes (Marra *et al.* 1992; Berger *et al.* 1993) (Tab. III). Ils codent pour un appareil de sécrétion de type IV permettant la synthèse et la translocation de molécules effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte, modulant ainsi les propriétés du phagosome (Segal *et al.* 1999b; Christie *et al.* 2000; Christie 2001) et rendant possible la croissance des légionelles dans les macrophages et les protozoaires (Sadosky *et al.* 1993; Segal *et al.* 1999a; Segal *et al.* 2002). La région I contient 7 gènes : *icm-V*, *-W* et *-X* et *dot-A*, *-B*, *-C* et *-D*, la région II 18 : *icmT*, *-S*, *-R*, *-Q*, *-P*, *-O*, *-N*, *-M*, *-L*, *-K*, *-E*, *-G*, *-C*, *-D*, *-J*, *-B*, *-F* et *-H*. Ces gènes sont probablement organisés selon 9 unités transcriptionnelles : *icmTS*, *icmR*, *icmQ*, *icmPO*, *icmMLKEGCD*, *icmJB*, *icmFtphA*, *icmWX*, et *icmV-dotA* (Zusman *et al.* 2003). La plupart d'entre eux interviennent dans le cycle intracellulaire de *L. pneumophila*.

Quinze protéines Dot/Icm ont des homologies de séquences avec des protéines impliquées dans le transfert conjugatif des plasmides IncL R64 et Col1b-P9 (Segal *et al.* 1997; Vogel *et al.* 1998; Komano *et al.* 2000). Par ailleurs des expériences avec le plasmide IncQ RSF1010 non auto-transmissible ont démontré que *L. pneumophila* est capable de transfert conjugatif à condition que certains gènes *dot/icm* soient présents et fonctionnels (Segal *et al.* 1998; Vogel *et al.* 1998).

Les fonctions de certaines protéines du complexe ont été en partie identifiées (Fig. 2). DotA est une protéine membranaire comprenant de larges domaines cytoplasmiques et périplasmiques (Roy *et al.* 1997), elle servirait de transporteur pour d'autres facteurs codés par Dot/Icm. Les gènes *icmQ*, *icmR* et *icmS* semblent spécifiques au système Dot/Icm et ne sont pas retrouvés dans d'autres systèmes de sécrétion de type IV (Segal *et al.* 1998). IcmR exerce une activité chaperonne vis-à-vis de IcmQ : en son absence celle-ci forme des complexes de haut poids moléculaire à la fois *in vivo* et *in vitro*, tandis que IcmR prévient et renverse la formation de ces complexes (Dumenil *et al.* 2001).

Tableau III : Correspondances des systèmes Dot/Icm et gènes homologues du plasmide R64 (Sexton *et al.* 2002)

Système Dot	Système Icm	Homologue dans le plasmide R64
DotA		TraY
	IcmV	TraX
	IcmW	TraV
	IcmX	TraW
DotD		TraH
DotC		TraI
DotB		TraJ
	IcmT	TraK
	IcmS	
	IcmR	
	IcmQ	
DotM	IcmP	TrbA
DotL	IcmO	TrbC
DotK	IcmN	TraL
DotJ	IcmM	
DotI	IcmL	TraM
DotH	IcmK	TraN
DotG	IcmE	TraO
DotF	IcmG	TraP
DotE	IcmC	TraQ
DotP	IcmD	TraR
DotN	IcmJ	TraT
DotO	IcmB	TraU
DotU		
DotV		

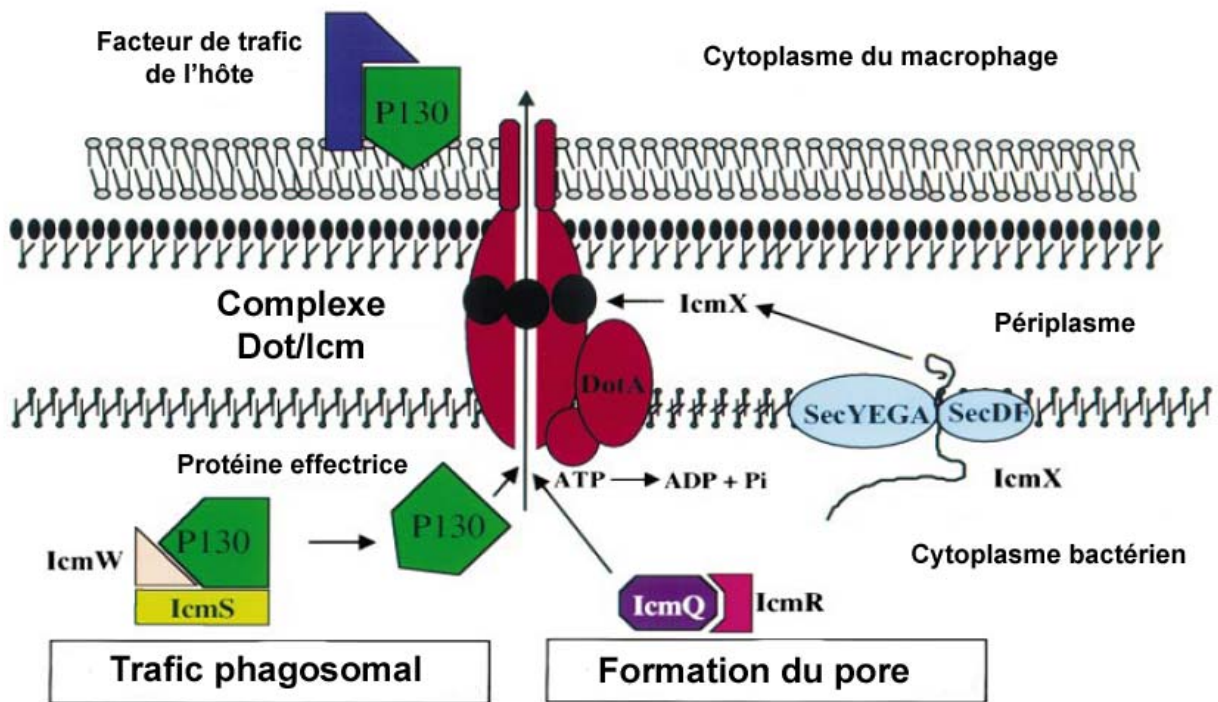


Figure 2 : Fonctions hypothétiques de certaines protéines du système Dot/Icm (Coers *et al.* 2000)

Le complexe IcmQ-IcmR semble réguler la formation d'un canal de translocation qui permet la sécrétion de protéines dans la cellule hôte. Le complexe IcmS-IcmW pourrait servir de système chaperon pour l'exportation de facteurs de virulence qui modulent le trafic des phagosomes (P130) (Coers *et al.* 2000). Le gène *icmX* code pour une protéine périplasmique de poids moléculaire 50kDA indispensable pour la biogenèse de la vacuole répliquative; elle est excrétée dans le milieu de culture quand les bactéries sont cultivées en bouillon nutritif mais n'est pas retrouvée dans le cytoplasme des cellules infectées (Matthews *et al.* 2000). Elle est transloquée dans le périplasme grâce au système Sec et pourrait servir de pont entre les composants du système Dot/Icm situés au niveau de la membrane interne et ceux situés au niveau de la membrane externe.

Les fonctions des autres constituants du système Dot/Icm sont mal connues. Les mutants *dotA*, *dotDCB*, *icmT*, *icmGCD*, et *icmJB* sont incapables d'induire l'apoptose chez les macrophages, et ont une capacité réduite à se multiplier dans les cellules et à induire une cytotoxicité par formation de pores (Molmeret *et al.* 2002; Zink *et al.* 2002). L'expression de *icmP*, *icmT* et *icmR* est modérément régulée par LetA (Gal-Mor *et al.* 2003). Des sites promoteurs en amont de certains gènes *dot/icm* ainsi que des sites de liaison de facteurs régulateurs ont été identifiés (Gal-Mor *et al.* 2002).

Bien que DotG/IcmE et DotB possèdent des homologies qui permettent de les classer dans les familles de protéines VirB10 et VirB11 codant pour des facteurs de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes (Day *et al.* 2001; Taminiau *et al.* 2002), il n'existe pas d'homologies de séquences entre les autres produits du système *dot/icm* et d'autres facteurs des systèmes de sécrétion de type IVA. Pour cette raison, les produits des gènes de conjugaison IncL et les gènes *dot/icm* ont été placés dans une nouvelle catégorie : les systèmes de sécrétion de type IVB (Christie *et al.* 2000; Sexton *et al.* 2002). *L. pneumophila* possède aussi un système de sécrétion de type IVA : *Ivh* (*Legionella vir homologues*) qui peut servir au transfert conjugatif mais qui n'a pas un rôle essentiel dans la croissance intracellulaire (Segal *et al.* 1999b).

I-1.5.2 Autres facteurs de virulence

I-1.5.2.a. Structures de surface

Le lipopolysaccharide (LPS) produit par *L. pneumophila* est un déterminant immunogène de surface majeur qui peut activer la voie classique ou la voie alternative du complément. *In vivo*, la modulation de l'expression d'un épitope du LPS chez des souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 est associée à une modulation de la virulence (Luneberg *et al.* 1998). La modulation de cette expression est contrôlée par l'incision et l'excision chromosomale d'un élément instable de 30 kilo-bases, probablement d'origine phagique. Chez la souche sauvage virulente l'élément est chromosomal, tandis que son excision et sa réplication en un grand nombre de plasmides résulte dans l'expression du phénotype avirulent (Luneberg *et al.* 2001). L'hydrophobicité importante du LPS de certaines souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 est due à la présence du gène *lag-1* codant pour une O-acétyltransferase entraînant la formation de résidus O- acétylés sur le polysaccharide O du LPS (Zou *et al.* 1999; Kooistra *et al.* 2001). Cette hydrophobicité pourrait expliquer en partie une meilleure survie dans les aérosols (Dennis *et al.* 1988), ainsi qu'une meilleure adhésion aux amibes et aux surfaces inertes (Davies 2000).

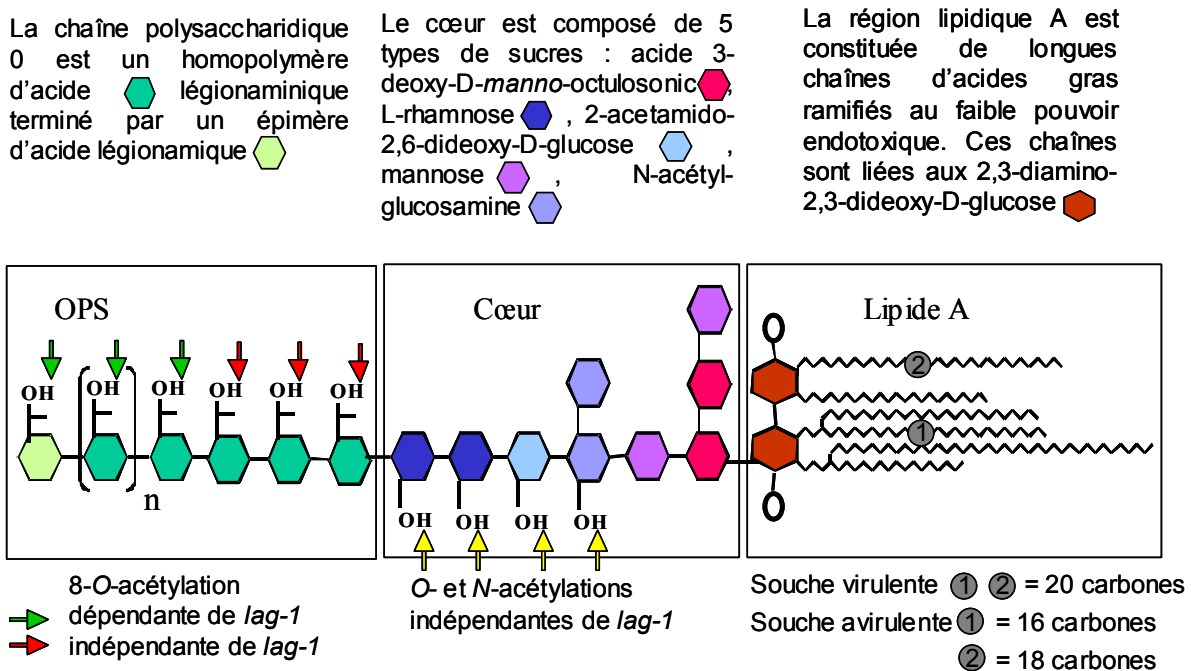


Figure 3 : LPS de *L. pneumophila* (d'après Kooistra *et al.*, 2001)

Par ailleurs il a été démontré que chez certaines souches le gène *lag-1* est instable : il peut être excisé, voire inséré (Bernander *et al.* 2003). L'excision résulte dans une absence de réactivité avec les anticorps monoclonaux de type 3/1 mais ne modifie pas le pulsotype obtenu en électrophorèse en champ pulsé. La forte prévalence de souches Mab 3/1 parmi les isolats cliniques semble confirmer l'importance de *lag-1* et de l'hydrophobicité dans la virulence.

Parmi les structures de surface impliquées dans la virulence, la protéine MOMP (Major Outer Membrane Protein) encodée par *ompS* permet l'attachement aux macrophages via les récepteurs CR1 et CR3 (Krinos *et al.* 1999). Les pili de type IV et la protéine de choc thermique Hsp60 (Fernandez *et al.* 1996) interviennent dans un mécanisme d'attachement aux amibes et aux cellules mammifères indépendant du complément (Stone *et al.* 1998).

L'action du flagelle augmente la probabilité de rencontre avec la cellule hôte et la capacité d'invasion (Bosshardt *et al.* 1997; Dietrich *et al.* 2001) mais n'est pas requise pour la multiplication intracellulaire (Dietrich *et al.* 2001). La synthèse de la sous-unité majeure FlaA du flagelle est sous la régulation du système LetA/LetS décrit par Lynch *et al.* et Hammer *et al.* (Hammer *et al.* 2002; Lynch *et al.* 2003). Elle est par ailleurs sous l'influence de différents facteurs environnementaux : température, viscosité, osmolarité, composition en acides aminés du milieu, ... Elle est régulée au niveau transcriptionnel par le facteur sigma-28 FliA (Heuner *et al.* 2002) et probablement par FlaR, un régulateur appartenant à la famille LysR (Ott *et al.* 1991; Heuner *et al.* 1999). La surexpression du gène *csrA* (carbon storage regulator) est associée à une réduction de la transcription de *fliA* et *flaA* par déstabilisation des ARN messagers correspondants (Fettes *et al.* 2001), et il a été démontré récemment que CsrA semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des phénotypes de transmission et de multiplication intra-cellulaire de *L. pneumophila* (Molofsky *et al.* 2003).

Enfin, la protéine de surface LvgA serait impliquée dans un grand nombre de fonctions contribuant à la résistance intra- et extra-cellulaire de *L. pneumophila*, les mécanismes dans lesquels elle serait impliquée restent à élucider (Edelstein *et al.* 2003).



### I-1.5.2.b. Sécrétion et acquisition de métabolites

Le système de sécrétion de type II permet le transport de phosphatases, d'une RNase, d'une zinc metalloprotéase, de mono- et tri-acylglycerol lipases, de la phospholipase A, de la lysophospholipase A et de la *p*-nitrophenyl phosphorylcholine hydrolase. Il est sous la dépendance du *locus pilBCD* impliqué dans la synthèse des pili de type IV et du *locus lspFGHIJK* qui code pour des pseudopilines (Rossier *et al.* 2001). La mutation de *pilD* empêche la légionelle d'infecter les cellules hôtes quelles qu'elles soient tandis que la mutation de *lspGH* n'empêche que la multiplication dans les amibes (Hales *et al.* 1999b; Aragon *et al.* 2000). Les facteurs sécrétés comprennent aussi la légiolysine qui permet l'hémolyse, la pigmentation marron et la résistance accrue à la lumière chez *L. pneumophila* mais qui n'intervient pas dans la croissance intracellulaire (Steinert *et al.* 2001).

La dépendance des légionelles vis-à-vis du fer a pour conséquence l'existence de nombreux mécanismes permettant son acquisition : synthèse de plusieurs chélateurs, dont la légiobactine (Liles *et al.* 2000), fixation et utilisation de l'hémine comme source de fer (O'Connell *et al.* 1996), synthèse d'enzymes ferrique-réductases périsplasmiques et cytoplasmiques (Johnson *et al.* 1991), synthèse d'une zinc metalloprotéase extracellulaire qui serait responsable de la digestion de la transferrine (James *et al.* 1997). L'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer est régulée par le régulateur transcriptionnel Fur. Le gène *frgA* spécifique de *L. pneumophila* régulé par Fur code pour une protéine homologue des aérobactine synthétases *lucA* et *lucC* (chélateurs de fer) d'*Escherichia coli* (Hickey *et al.* 1997). Un opéron double gène *iraAB* serait nécessaire à l'assimilation du fer, à l'infection intracellulaire et à la virulence (Viswanathan *et al.* 2000). Le gène *iraA* jouerait un rôle dans la virulence grâce à une méthyltransférase, et *iraB* permettrait l'acquisition du fer extracellulaire selon un nouveau mécanisme utilisant des peptides chargés en fer. Le gène de maturation du cytochrome *c*, *ccmC* (Polesky *et al.* 2001), ainsi que le gène *feoB* impliqué dans le transport des ions ferreux (Robey *et al.* 2002) jouent aussi un rôle dans l'acquisition du fer.

#### I-1.5.3.c. Infection des macrophages

La protéine Mip (Macrophage Infectivity Potentiator) est importante pour l'invasion et l'établissement intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages et les protozoaires mais pas pour la réplication (Wieland *et al.* 2002). Bien que la structure de la protéine Mip et ses fonctions enzymatiques soient élucidées, on ne connaît toujours pas les mécanismes exacts qui l'impliquent dans la virulence. Récemment il a été démontré que la partie N-terminale et la dimérisation de Mip, ainsi que son activité peptidylprolyl *cis/trans* isomérase sont nécessaires à l'infection des cellules pulmonaires du cobaye. En revanche, l'activité enzymatique n'est pas nécessaire à l'invasion d'*A. castellanii*, tandis que la partie N-terminale et la dimérisation le sont (Kohler *et al.* 2003). Des protéines "Mip-like" ont été mises en évidence chez d'autres pathogènes : *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Trypanosoma cruzi* et *Escherichia coli*.

Les régions *pmi* (protozoa and macrophage infectivity), *mil* (macrophage infectivity *loci*), *eml* (early stage macrophage-induced *locus*) et *enh* (enhanced entry) codent pour des facteurs intervenant dans la virulence (entrée dans les cellules et modification de la voie endosomale) mais dont le rôle exact est généralement mal connu (Abu Kwaik *et al.* 1996; Gao *et al.* 1997; Harb *et al.* 2000). Seul le gène *rtxA* appartenant au *locus enh1* a été caractérisé. Il est impliqué dans l'adhérence, la cytotoxicité, la formation de pores et l'entrée de *L. pneumophila* dans la cellule hôte (Cirillo *et al.* 2001).

#### I-1.5.3.d. Facteurs de virulence divers

Le gène *ptsP* serait impliqué dans la transduction du signal pour l'expression de facteurs de virulence. Sa mutation entraîne une absence de multiplication dans certains types de cellules mammifères et une absence complète dans d'autres (Higa *et al.* 2001). Récemment, une enzyme UDP-glucosyltransferase, possédant un substrat chez l'hôte eucaryote, a été isolée et pourrait représenter un facteur de virulence important (Belyi *et al.* 2003). Un îlot de pathogénicité de 65 kb a été mis en évidence chez les souches de *L. pneumophila* Philadelphia-1. Il code pour 70 protéines, dont un certain nombre de facteurs de virulence : régulateur de stockage

du carbone *csrA*, peptide methionine sulfide réductases *msrAB*, groupes de gènes présentant de fortes similarités avec des gènes codant pour des appareils de sécrétion de type IV et des protéines transmembranaires. L'importance de cet îlot de pathogénicité dans la virulence n'a pas été démontrée (Brassinga *et al.* 2003).

#### I-1.5.3. Transfert conjugatif de la virulence chez *L. pneumophila*

Une étude récente publiée par Miyamoto *et al.* démontre qu'une souche avirulente de *L. pneumophila* peut acquérir le phénotype virulent grâce à un transfert conjugatif d'ADN chromosomal à partir d'une souche virulente (Miyamoto *et al.* 2003). Les auteurs ont démontré que le locus *dot/icm* peut être transféré horizontalement *via* ce mécanisme de conjugaison, et que la conjugaison peut avoir lieu entre deux souches de sérogroupes différents. C'est semble-t-il la première fois qu'un tel transfert de virulence à partir d'ADN chromosomal est observé. Les auteurs suggèrent que ce transfert pourrait avoir lieu dans les biofilms, et qu'il pourrait jouer un rôle important dans l'évolution des légionelles.

### **I-1.6. Cycle intracellulaire de *Legionella pneumophila* (Fig. 4)**

#### I-1.6.1. Evènements précoces

##### *I-1.6.1.a. Phagocytose*

Plusieurs modes de pénétration de *L. pneumophila* dans les monocytes et les macrophages sont rapportés dans la littérature. La phagocytose conventionnelle dépend de l'opsonine et se fait *via* la liaison des bactéries aux récepteurs des intégrines CR1 et CR3 (Payne *et al.* 1987). La protéine de surface OmpS forme un canal perméable aux ions et se lie à des composants du complément : C3b et C3bi qui feront le lien avec CR1 et CR3 (Bellinger-Kawahara *et al.* 1990). La fixation de *L. pneumophila* à CR3 active une tyrosine kinase et une protéine kinase, conduisant à la phosphorylation de protéines cellulaires entraînant un réarrangement du cytosquelette (polymérisation de l'actine) qui permet la pénétration de la bactérie (Coxon *et al.* 1998). Ces mécanismes de phagocytose médiée par CR3 ne seraient pas spécifiques aux légionelles. Il semblerait que certaines bactéries soient phagocytées par un processus d'enroulement d'un pseudopode autour de la bactérie

("coiling phagocytosis"), ce processus ne serait pas lié à la virulence des souches (Rechnitzer *et al.* 1989) mais serait plus spécifique du phénotype exprimé par les légionelles déjà issues d'une multiplication intra-cellulaire (Faulkner *et al.* 2002). Watarai *et al.* ont aussi évoqué l'existence d'une pénétration par macropinocytose médiée par Dot/Icm et qui serait relativement indépendante de l'opsonisation (Watarai *et al.* 2001). Chez la souris ce mécanisme fait aussi intervenir un *locus* appartenant à l'hôte : *Ign 1*, codant pour des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose. Des mécanismes non spécifiques d'adhésion aux cellules, indépendants du complément et des anticorps, ont aussi été mis en évidence et permettent la pénétration dans les cellules épithéliales (Gibson *et al.* 1994; Garduno *et al.* 1998b).

#### *I-1.6.1.b. Interception du trafic vésiculaire et inhibition de la fusion phagolysosomiale*

Dès que la bactérie a pénétré dans la cellule, le trafic vésiculaire provenant du réticulum endoplasmique est détourné. Par ailleurs, l'apoptose est déclenchée très rapidement après la pénétration dans la cellule, *via* l'activation de la caspase 3 par le système Dot/Icm (Gao *et al.* 1999a, b). Des vésicules ainsi que des mitochondries se lient immédiatement au phagosome (Tilney *et al.* 2001) et la fusion avec les lysosomes n'a pas lieu. Ces événements seraient directement contrôlés par des substrats injectés par Dot/Icm dans la cellule hôte (Hilbi *et al.* 2001; Watarai *et al.* 2001). DotA semble jouer un rôle important dans la formation de pores dans la membrane de la cellule hôte et pourrait elle-même être injectée dans le cytoplasme. En effet, elle est sécrétée en quantités importantes par des bactéries cultivées en bouillon. C'est une protéine de membrane interne qui possède 8 hélices transmembranaires (Roy *et al.* 1998). Par ailleurs, des essais de mutation de *dot/icm* ont montré que seuls les mutants des gènes *icmW* ou *icmS* sont encore capables de la sécréter, les mutations des autres gènes entraînant une absence de sécrétion et une incapacité des mutants à survivre dans la cellule (Zuckman *et al.* 1999). Si les bactéries expriment DotA pendant l'infection mais ne l'expriment plus juste après la pénétration dans la cellule, elles restent capables de se multiplier dans la cellule : ceci suggère que DotA joue un rôle fondamental dans la régulation du trafic phagosomal initial, mais n'est pas indispensable dans les étapes de multiplication

(Roy *et al.* 1998). Le recrutement de vésicules provenant du réticulum endoplasmique fait aussi intervenir une protéine ARF (ADP-ribosylation factor) liant le GTP et habituellement impliquée dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi chez les cellules eucaryotes. La présence chez la cellule hôte d'une protéine ARF fonctionnelle est indispensable. L'addition de bréfeldine A, un inhibiteur de l'activation de ARF, interrompt le transport des vésicules et l'établissement d'une vacuole de réplication est rendu impossible (Kagan *et al.* 2002).

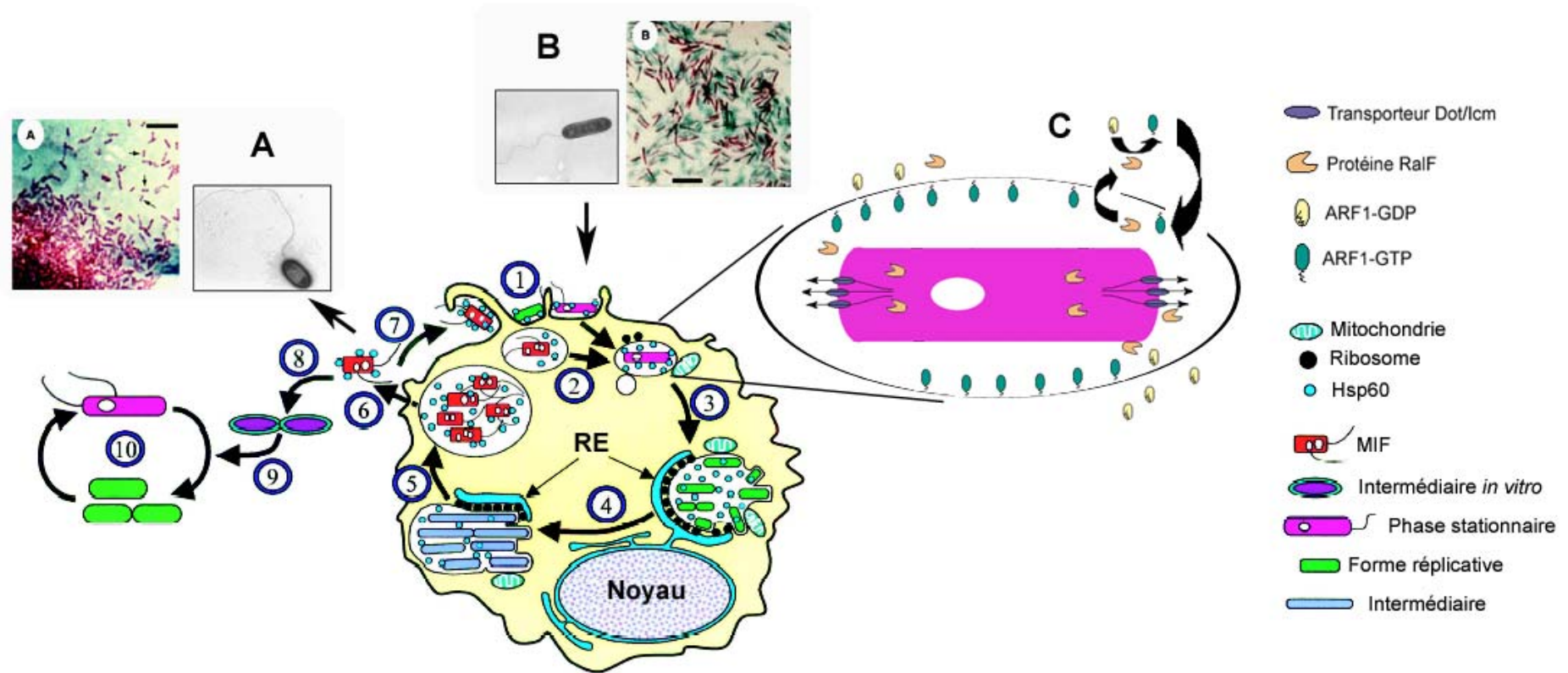
La protéine de choc thermique Hsp60, membre de la famille de protéines chaperonnes GroEL, serait nécessaire pour l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales HeLa par des souches virulentes de *L. pneumophila* (Garduno *et al.* 1998c; Garduno *et al.* 1998a). De plus, sa synthèse est augmentée très rapidement après la pénétration dans la cellule hôte et elle est libérée dans les phagosomes (Fernandez *et al.* 1996). La glycoprotéine LAMP-1 est habituellement retrouvée en grandes quantités dans les membranes des endosomes et des lysosomes matures, son rôle serait de protéger ces membranes de leur contenu acide et protéolytique. Cette protéine, ainsi que la protéase lysosomale cathepsine D, sont relativement peu abondantes (25 et 10% respectivement) dans les phagosomes précoces contenant une souche virulente de *L. pneumophila* vivante (Roy *et al.* 1998). Des études de colocalisation à l'aide de marquages fluorescents complètent ces observations. Après marquage des bactéries à la fluorescéine et des lysosomes à la rhodamine, l'observation en microscopie confocale permet la mise en évidence de la colocalisation. Ces études ont permis de montrer que seulement 25 à 30% des phagosomes contenant une souche sauvage de *L. pneumophila* colocalisent avec les lysosomes 30 minutes après l'infection, tandis que pour des souches mutées pour *icmX*, *dotA*, *dotB*, *icmE*, *icmR* et *icmB* cette colocalisation s'élève à 70 à 80% des phagosomes (Wiater *et al.* 1998). Dans les deux cas, ces pourcentages restent stables 6 heures après l'infection, indiquant que le détournement du trafic phagolysosomal a lieu précocement.

#### I-1.6.2. Réplication et fusion avec le réticulum endoplasmique

Le phagosome est entouré de nombreuses vésicules, mais aussi de ribosomes (Tilney *et al.* 2001). La protéine eucaryote ARF1 s'accumule dans les

phagosomes grâce à la protéine RaIF sécrétée par *L. pneumophila*. Cette protéine serait sécrétée dans le phagosome grâce au système de sécrétion de type IV, puis une translocation l'amènerait jusqu'au cytoplasme de la cellule hôte. Elle stimulerait alors la conversion de GDP en GTP, permettant la conversion des complexes ARF-GDP cytoplasmiques en complexes ARF-GTP qui se lient majoritairement à la surface cytosolique des membranes des vésicules (Kagan *et al.* 2002; Nagai *et al.* 2002). Bien que le rôle exact de RaIF soit encore mal connu, elle pourrait aider à la biogenèse efficace d'une vacuole de réplication dans des conditions de stress pour la cellule hôte telles que les échanges vésiculaires devraient normalement être faibles. Elle interviendrait donc aussi dans le processus de fusion avec le réticulum endoplasmique (Kahn *et al.* 2002; Nagai *et al.* 2003a).

Après une phase de latence de 6 à 10 heures durant laquelle le phagosome s'associe avec le réticulum endoplasmique, la réplication bactérienne débute. La bactérie passe de l'expression d'un phénotype virulent, nécessaire à la survie dans l'environnement et à l'infection des cellules hôtes, à l'expression d'un phénotype de croissance exponentielle. Après 10 à 14 heures la croissance est maximale et le phénotype des bactéries est nettement différent de celui des bactéries en phase infectieuse (Faulkner *et al.* 2002). Sturgill *et al.* ont observé que les bactéries en phase exponentielle de croissance sur milieu de culture n'expriment pas les facteurs de virulence leur permettant d'échapper à la fusion phagolysosomale et ont formulé l'hypothèse qu'il en serait de même pour les bactéries en phase exponentielle de croissance dans les cellules. En effet, leurs expériences semblent démontrer qu'après 16 à 18 heures un nombre important de vacuoles de réplication acquiert des caractéristiques lysosomales : 70% contiennent LAMP-1, 40% de la cathepsine D et 50% des traceurs endosomaux ajoutés aux cellules avant ou après l'infection (Sturgill-Koszycki *et al.* 2000). Ainsi, après 16 à 18 heures, deux types de vacuoles de réplication coexisteraient : des vacuoles de pH 7,4 ayant échappé à la fusion lysosomale (environ 60%) et des vacuoles à pH 5,6 ayant fusionné (environ 40%). La contribution de chaque type de vacuoles à la multiplication de *L. pneumophila* n'est pas connue. La maturation du phagosome contenant *L. pneumophila* ressemble donc à un processus d'autophagie (Sturgill-Koszycki *et al.* 2000), mécanisme par lequel les cellules eucaryotes lysent des organelles cellulaires *via* une fusion de vésicules provenant du réticulum endoplasmique avec les lysosomes.



**Figure 4 : Représentation schématique des cycles de croissance intra- et extra-cellulaire de *L. pneumophila*. D'après Faulkner *et al.*, 2002, Kahn *et al.*, 2002, Garduno *et al.*, 2002 et Dietrich, 2000.**

(1) Différents phénotypes de *Lp* peuvent s'attacher et entrer dans la cellule hôte (2) Le phagosome s'associe avec le Reticulum Endoplasmique (RE) pour former le compartiment répliquatif (3) Des formes intermédiaires présentant une morphologie distincte apparaissent tandis que la réplication se poursuit (4) A la fin de la réplication intra-cellulaire les formes MIFs se différencient et acquièrent un phénotype de virulence maximale (5) Les MIFs sont libérées, extra-cellulaires ou dans des vésicules (6) Les MIFs ou les vésicules remplies de MIFs peuvent entamer un nouveau cycle (7) Les MIFs libérées peuvent aussi initier un cycle de croissance extra-cellulaire après différenciation en une forme intermédiaire répliquative (8) Les formes intermédiaires se différencient en formes extra-cellulaires à réplication active (9) pendant le cycle de croissance extra-cellulaire *Lp* alterne entre le phénotype de croissance exponentielle et le phénotype de phase stationnaire (10).

A : Aspect du phénotype MIF en coloration de Gimenez et en microscopie électronique à transmission

B : Aspect du phénotype en phase post-exponentielle de croissance extra-cellulaire

C : Recrutement de ARF1-GTP à la surface cytosolique des membranes des phagosomes grâce à la protéine RalF

### I-1.6.3. Sortie de la cellule

En fin de phase de croissance intracellulaire, la déplétion en acides aminés entraîne la transition du phénotype répliatif vers le phénotype infectieux. Cette réponse stringente est une réponse globale résultant de la fixation d'ARNt non chargés aux ribosomes qui activent alors l'enzyme RelA, une guanosine 3P,5P-bispyrophosphate synthétase. L'accumulation de ppGpp (alarmone) dans la cellule entraîne une inhibition de la synthèse d'ARN stables et une accumulation du facteur stationnaire sigma RpoS (Hammer *et al.* 1999). Ce facteur est indispensable à la croissance dans *Acanthamoeba castellanii* mais pas à celle dans les cellules humaines HL-60 et THP-1 (Hales *et al.* 1999a). Sa transcription est régulée par LetA/LetS (Hammer *et al.* 2002; Lynch *et al.* 2003). L'accumulation de RpoS entraîne l'expression de facteurs de virulence : sensibilité au NaCl, motilité maximale, cytotoxicité, résistance osmotique (Watarai *et al.* 2001). La nécrose de la cellule hôte permet la libération de plusieurs centaines de bactéries prêtes à infecter de nouvelles cellules. IcmT semble être nécessaire à la formation des pores dans la paroi cellulaire qui permettront la sortie de *L. pneumophila* (Molmeret *et al.* 2002). Des études de microscopie ont permis de mettre en évidence des particularités importantes chez les bactéries libérées suites à une croissance intracellulaire (Mature Intracellular Forms) : elles sont courtes, ramassées, possèdent une membrane externe dense, un cytoplasme occupé par de nombreuses granulations de polyhydroxybutyrate (Garduno *et al.* 2002). La coloration de Gimenez les différencie nettement des bactéries cultivées sur milieu artificiel. Elles sont plus résistantes à la rifampicine, à la gentamicine, aux détergents et aux pH élevés et ont une activité métabolique réduite.

### I-1.7. Cycle intra-amibien de *Legionella pneumophila*

D'une manière générale, même s'il existe quelques différences significatives (Neumeister *et al.* 1997), le cycle de *L. pneumophila* à l'intérieur des protozoaires est relativement semblable à celui qui a lieu dans les cellules animales (Segal *et al.* 1999a). Des différences existent entre les mécanismes impliqués chez différentes espèces de protozoaires.



Du fait de l'absence de complément, l'entrée dans les protozoaires a lieu différemment : attachement à une lectine Galactose / Galactose *N*-acetylgalactosamine de 170 kDa dans le cas de *H. vermiformis* (Venkataraman *et al.* 1997), sans doute à un autre type de structure pour l'entrée dans *Acanthamoeba polyphaga* (Harb *et al.* 1998). Chez *H. vermiformis*, l'entrée est associée à une déphosphorylation réversible de nombreuses protéines hôtes, alors que chez *A. polyphaga* seule une protéine est légèrement déphosphorylée; la synthèse de protéines par *H. vermiformis* est requise pour l'entrée, ce n'est pas le cas pour *A. polyphaga* (Harb *et al.* 1998).

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, certains *loci* de virulence nécessaires pour l'invasion des cellules animales ne sont plus indispensables à l'invasion des protozoaires tandis qu'inversement des *loci* qui n'étaient pas nécessaires chez les cellules animales le deviennent chez les protozoaires. Ainsi les *loci mil* ne sont plus indispensables (Gao *et al.* 1998) tandis que le gène *rpoS* est requis pour la croissance dans *A. castellanii* (Hales *et al.* 1999a). Les protéines de stress Hsp60 et le gène *htrA/degP* codant pour une chaperonne protéase périplasmique ne sont pas nécessaires (Pedersen *et al.* 2001). Lors de sa réplication intra-amibienne, *L. pneumophila* présente aussi différentes morphologies, proches de celles observées lors de la réplication dans les cellules mammifères (Greub *et al.* 2003).

### **I-1.8. Cycles intracellulaires (cellules mammifères et protozoaires) des autres espèces de légionelles**

La capacité des autres espèces de légionelles à se multiplier dans les protozoaires et/ou les cellules mammifères est très variable non seulement suivant les espèces mais aussi suivant les souches. Une étude menée par Neumeister *et al.* (Neumeister *et al.* 1997) a permis de classer les légionelles dans 7 groupes en fonction de leur capacité à se multiplier dans les amibes (*A. castellanii*) et dans les macrophages (cellules Mono Mac 6) :

- *L. longbeachae* séro groupe 1, *L. jordanis*, et *L. anisa* ne sont pas capables de se multiplier dans ces deux types de cellules,

- *L. dumoffii* ne se multiplie pas dans les cellules Mono Mac 6 mais montre une multiplication retardée dans *A. castellanii* 72 h après l'infection,
- *L. steigerwaltii*, *L. gormanii*, *L. pneumophila* séro groupe 6 ATCC 33215, *L. bozemanii*, et *L. micdadei* restent en nombre stable dans les cellules Mono Mac 6 après l'infection mais ne persistent pas dans l'amibe,
- *L. oakridgensis* est capable d'une légère multiplication dans les cellules Mono Mac 6 mais est tuée dans l'amibe,
- Une souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 Philadelphia obtenue après 30 passages sur gélose et une souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 Philadelphia obtenue après croissance intrapéritonéale chez des cobayes sont capables de se multiplier dans les cellules Mono Mac 6 mais leur nombre décroît dans *A. castellanii*,
- Quelques souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 Philadelphia, une souche de *L. pneumophila* séro groupe 2, et un isolat clinique de *L. pneumophila* séro groupe 6 sont capables de se multiplier dans les deux hôtes,
- Une souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 Bellingham cultivée de nombreuses fois sur agar et une souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 Bellingham cultivée moins de 3 fois sur agar après inoculation et croissance intrapéritonéale en cobaye montrent une croissance plus importante dans les cellules Mono Mac 6 comparée au groupe précédent, mais réduite dans l'amibe.

Ogawa *et al.* ont observé en coloration de Gimenez l'aspect de *L. pneumophila* Philadelphia (Fig. 5A) et de plusieurs espèces de légionelles après 24 h de croissance dans les cellules Vero (Ogawa *et al.* 2001). Les morphologies ainsi que les localisations très différentes (endosomes et/ou cytoplasme) suggèrent que les mécanismes impliqués dans la multiplication sont eux aussi différents. *L. bozemanii* forme des microcolonies de type "pelotes de laine" qui sont accompagnées de bactéries filamenteuses et sont localisées dans des endosomes entourés de réticulum endoplasmique rugueux (Fig. 5B). *L. oakridgensis* forme des chaînettes en serpentins avec des amas de bactéries au centre (Fig. 5C) et la microcolonie est située dans un endosome autour duquel sont recrutées de nombreuses mitochondries. *L. jordanis* se présente sous forme de microcolonies sphériques et denses (Fig. 5D), certaines situées dans des endosomes, d'autres

dans le cytoplasme. *L. feeleii* ne forme pas d'amas : les bactéries sont dispersées dans le cytoplasme (Fig. 5E), entourées de nombreuses mitochondries. Enfin *L. dumoffii* forme des amas importants dispersés dans la cellule (Fig. 5F), certains sont entourés d'une membrane endosomale d'autre pas. Les mécanismes impliqués dans l'entrée de cette même espèce (souche ATCC 33343) dans les cellules Vero ont été comparés avec ceux impliqués dans l'entrée de *L. pneumophila* Philadelphia-1 en traitant les cellules avec des molécules bloquant différentes étapes de ce processus (Maruta *et al.* 1998). L'entrée de *L. dumoffii* Tex-KL nécessite une endocytose médiée par récepteur tandis que celle de *L. pneumophila* utilise principalement une phagocytose médiée par des microfilaments. La polymérisation des microtubules est nécessaire pour les deux espèces. Les auteurs ont aussi remarqué que *L. dumoffii* peut proliférer dans le cytoplasme.

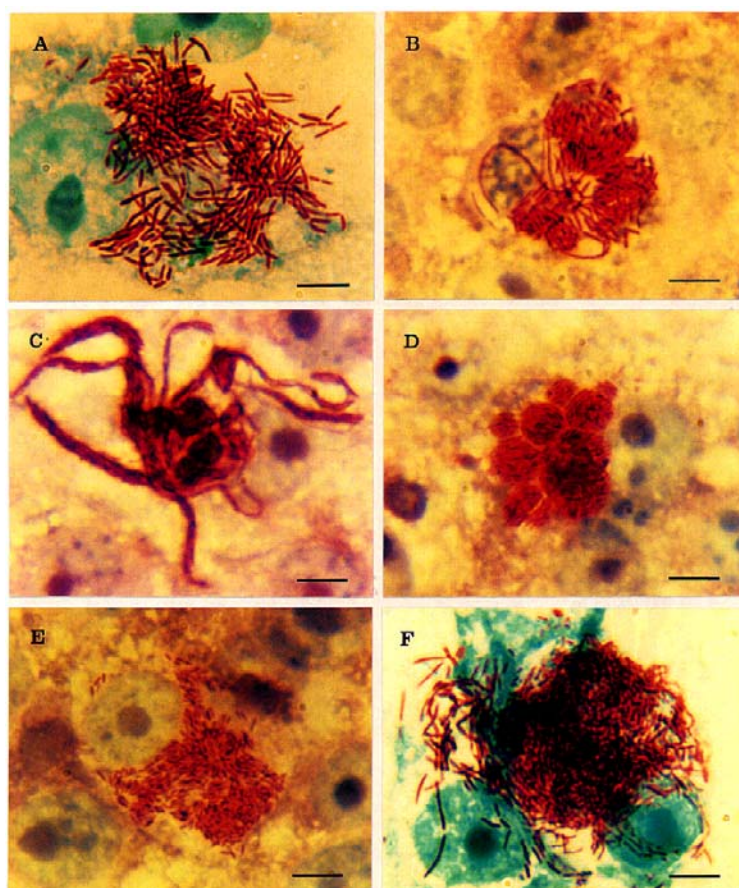


Figure 5 : Aspect en coloration de Gimenez de différentes espèces de légionelles après 24 h de multiplication dans les cellules Vero (Ogawa *et al.* 2001). Barre : 10  $\mu$ m

Joshi *et al.* ont étudié chez *L. micdadei* plusieurs caractères phénotypiques liés à la virulence chez *L. pneumophila* et ont remarqué que dans la plupart des cas ces caractères n'étaient pas exprimés chez *L. micdadei*. Ils ont cependant réussi à isoler une souche qui, bien que n'exprimant pas tous les phénotypes de virulence étudiés, était capable de se multiplier dans les macrophages aussi efficacement que *L. pneumophila*. Les auteurs en arrivent également à la conclusion que les mécanismes de l'invasion sont différents chez ces deux espèces (Joshi *et al.* 1999). Abu Kwaik *et al.* ont montré que le mécanisme de la pénétration dans *H. vermiformis* était le même que pour *L. pneumophila* (récepteur de type lectine), mais que *L. micdadei* était ensuite internalisée dans des phagosomes qui ne sont pas entourés par du réticulum endoplasmique rugueux (Abu Kwaik *et al.* 1998a). Une observation légèrement différente a été faite concernant l'invasion des cellules Mono Mac 6 : bien qu'en microscopie le phagosome contenant *L. micdadei* ne soit pas entouré de réticulum, il est marqué par des anticorps anti-calnexine, marqueur spécifique du réticulum endoplasmique (Gerhardt *et al.* 2000).

L'infection des cellules Mono Mac 6 par *L. longbeachae* donne lieu à la formation de phagosomes dérivés du réticulum endoplasmique rugueux, bien qu'il ait aussi été observé la formation de phagosomes dérivés du réticulum lisse (Gerhardt *et al.* 2000). Une étude portant sur la virulence de plusieurs souches de cette espèce vis-à-vis de modèles animaux (cobayes) et des cellules macrophagiques U937 a confirmé cette observation : les souches virulentes sont dirigées vers des phagosomes identiques à ceux formés lors de l'infection par *L. pneumophila*, tandis que des souches dont la virulence est atténuée sont localisées dans des phagosomes dérivés du réticulum endoplasmique lisse, et ces phagosomes ne sont pas entourés d'organites cellulaires (Doyle *et al.* 2001). Le gène *mip* de cette espèce partage une grande homologie avec celui de *L. pneumophila*, sa mutation entraîne une absence de multiplication intra-amibienne et une diminution de la virulence vis-à-vis des cobayes (Doyle *et al.* 1998). De même que *L. pneumophila*, *L. longbeachae* est capable d'induire l'apoptose par activation de la voie des caspases (Arakaki *et al.* 2002).

## I-2. DETECTION ET TYPAGE DES LEGIONELLES

### I-2.1. Détection des légionelles

#### I-2.1.1. Culture

La culture des légionelles à partir de prélèvements environnementaux n'est pas aisée. En effet, ces prélèvements sont contaminés par d'autres microorganismes à croissance plus rapide que celle des légionelles, rendant nécessaire l'utilisation de traitements de sélection. Ces traitements, bien qu'indispensables, entraînent un abattement relatif des légionelles dont la quantité est finalement sous-estimée (Coubrough *et al.* 2002).

La méthode de référence (AFNOR T90-431) prend en compte ces limitations en proposant plusieurs analyses pour un même échantillon :

- ensemencement direct de 200  $\mu$ L et 200  $\mu$ L d'une dilution au dixième en tampon PBS sur gélose sélective GVPC (= BCYE + cycloheximide, glycine, polymixine B et vancomycine),
- concentration du reste du prélèvement par filtration sur membrane de polycarbonate 0,22  $\mu$ m, et reprise de la membrane dans 5 mL du prélèvement initial. 3 minutes de sonication assurent un détachement des bactéries. 100  $\mu$ L de ce concentré sont ensemencés sur gélose sélective,
- traitement de sélection acide : mélange de 2 mL d'une solution de KCl/HCl pH 2 avec 2 mL de concentré, incubation 5 minutes à température ambiante et ensemencement sur géloses sélectives,
- traitement de sélection thermique : incubation de 2 mL de concentré 30 minutes à 50°C, puis ensemencement sur géloses sélectives.

L'incubation des géloses dure 10 jours à 37°C sous atmosphère humide + CO<sub>2</sub>. Les colonies suspectes sont repiquées sur géloses BCYE et BCYE sans L-cystéine, les légionelles ne se développeront que sur gélose BCYE.

La plupart des travaux ayant comparé les deux méthodes de prétraitement arrivent à la conclusion que le traitement thermique épargne un plus grand nombre de légionelles tout en assurant une bonne sélectivité (Leoni *et al.* 2001; Bartie *et al.* 2003). Par ailleurs, l'ensemencement sur milieu sélectif MWY (BCYE + anisomycine, glycine, polymixine B, vancomycine, pourpre de bromocrésol et bleu de

bromothymol) semble donner de meilleurs résultats que sur GVPC (De Luca *et al.* 1999).

L'incubation des concentrats à 35°C pendant une dizaine de jours permettrait une libération des légionelles intra-protazoaires et une amélioration de la détection par culture sur géloses (Sanden *et al.* 1992; Bartie *et al.* 2003). Les légionelles à l'état viable mais non cultivable peuvent aussi être "ressuscitées" par mise en contact avec des amibes à l'intérieur desquelles elles redeviendront actives (Steinert *et al.* 1997).

Les prélèvements par écouvillonnage ou grattage des surfaces en contact avec l'eau potentiellement contaminée semblent nécessaires puisqu'ils permettent une détection plus sensible due à une concentration de légionelles plus importante (Wright *et al.* 1989; Ta *et al.* 1995). Ce constat a d'ailleurs amené certaines sociétés à commercialiser des "pièges à légionelles présentes dans les biofilms" afin de permettre des détections plus sensibles (Fig. 6).

Une étude réalisée sur des prélèvements d'eau de tours aéro-réfrigérantes a mis en évidence une variation importante des quantités de légionelles dénombrées sur un même lieu d'une semaine à l'autre. Le résultat d'une analyse rendu 10 jours après le prélèvement n'est donc pas le reflet fidèle de la contamination du lieu de prélèvement à ce même moment, rendant encore plus difficile l'évaluation du risque (Bentham 2000).

Enfin, le prélèvement et la culture de panaches de vapeurs d'eau potentiellement contaminées sont réalisés grâce à des impacteurs : l'air est aspiré, les bactéries sont collectées dans du BCYE liquide qui est ensuite soumis aux mêmes traitements de sélection que les prélèvements d'eau (Ishimatsu *et al.* 2001).



TECHNOLOGIES PTY LTD  
WATER QUALITY CONTROL



Quality System  
Endorsed Company  
ISO 9001

---

## Biofilm Legionella Trap

---

**Simple and Inexpensive Device  
to allow for  
Biofilm Evaluation  
and Legionella presence  
on Cooling Water Systems**

- ✓ Simple and easy device to install
- ✓ UV resistant, Corrosion resistant and Inexpensive
- ✓ Allows Biofilm to grow on glass beads,  
for laboratory evaluation
- ✓ NATA Microbiological Laboratory can determine
  - The biofilm thickness in microns
  - Presence of Protozoa or Amoebae
  - LDB count as cfu/cm<sup>2</sup> surface area
  - HPC count as cfu/cm<sup>2</sup> surface area

Test for the presence of Legionella in its preferred habitat in the biofilm.  
Improve Heat Transfer efficiency with reduced biofilm growths.

ADVANCED TECHNOLOGY FOR THE NEW MILLENNIUM



Model - BLT100



Figure 6 : Encart publicitaire pour un "Piège à légionelles"

### I-2.1.2. Méthodes moléculaires

#### I-2.1.2.a. Extraction de l'ADN et PCR

L'extraction de l'ADN à partir d'échantillons environnementaux constitue une étape limitante de ces méthodes. Les légionelles peuvent se trouver à l'intérieur d'amibes elles-mêmes sous forme de trophozoïtes (forme active, généralement fragile et facile à lyser) ou de kystes (forme dormante très résistante aux traitements de lyse). Différentes procédures peuvent être utilisées pour lyser les trophozoïtes : détergents tels que le Triton X-100 (Miltner *et al.* 2000), la saponine (Essig *et al.* 1997; Robey *et al.* 2002) ou le SDS (Horn *et al.* 2000), cycles de congélations décongélations successives ou chocs osmotiques suivis de plusieurs passages de la suspension au travers d'une aiguille de faible diamètre, la pression importante lysant alors les amibes (Bozue *et al.* 1996). Concernant les kystes la meilleure méthode

consiste sans doute à les remettre en culture afin de permettre l'apparition des trophozoïtes. Par ailleurs des inhibiteurs de PCR peuvent être présents dans les échantillons environnementaux. Il faut alors essayer de purifier l'ADN afin d'obtenir la matrice la plus propre possible, ou récupérer sélectivement les légionelles à partir de l'échantillon avant extraction de l'ADN grâce à des procédés de séparation immunomagnétique (Riffard *et al.* 2001). Le kit d'extraction Qiagen (QIAamp DNA minikit; Qiagen, Hilden, Allemagne), considéré comme efficace pour extraire l'ADN de bactéries intracellulaires (Wellinghausen *et al.* 2001), était souvent employé. Cependant deux études ont démontré que les colonnes utilisées dans ces kits pouvaient être contaminées par de l'ADN de légionelle, les rendant donc inutilisables dans un but de détection/quantification (van der Zee *et al.* 2002; Evans *et al.* 2003).

De nombreuses méthodes de PCR ont été utilisées : PCR ciblant des séquences spécifiques du genre *Legionellae* ou de l'espèce *L. pneumophila* (kit EnviroAmp par exemple (Lye *et al.* 1996; Declerck *et al.* 2003)), PCR nichées ciblant le gène *mip* (Catalan *et al.* 1994) ou l'ADN ribosomal (Miyamoto *et al.* 1997b), RT-PCR pour tenter de détecter spécifiquement les légionelles viables (Bej *et al.* 1991), PCR suivies d'un séquençage (Cloud *et al.* 2000) ou d'une hybridation avec une sonde spécifique d'espèce (van Der Zee *et al.* 2002), et plus récemment PCR quantitative permettant de quantifier en une seule réaction l'ADN de *Legionellae* et l'ADN de *L. pneumophila* grâce à l'utilisation simultanée de deux paires d'amorces marquées avec des fluorochromes différents (Reischl *et al.* 2002). Les différentes amorces utilisées pour ces PCR ciblent généralement l'ADN ribosomal 16S ou le gène *mip* et peuvent être utilisées dans la fabrication de puces à ADN pour la détection simultanée de nombreux pathogènes (Call *et al.* 2003; Peplies *et al.* 2003).

#### *I-2.1.2.b. Sondes ciblant l'ARN ribosomal*

Une autre technique de détection consiste en l'utilisation de sondes ciblant l'ARN ribosomal. Les ribosomes jouent un rôle clé dans la machinerie cellulaire de synthèse des protéines. Chaque cellule contient 10 000 à 100 000 ribosomes. Un ribosome d'*Escherichia coli* a un coefficient de sédimentation de 70S (unités Svedberg), et peut être dissocié en deux sous-unités de 50S et 30S consistant en un assemblage de protéines et d'ARN. La sous-unité 30S contient 21 protéines



différentes et une molécule d'ARNr 16S. Une molécule d'ARN 16S contient en moyenne 1 500 nucléotides. La comparaison de la séquence des ARN 16S de différentes espèces bactériennes a permis de démontrer que cette molécule comporte des segments présentant différents degrés de variabilité. L'alignement des séquences d'ARNr 16S a permis la construction d'arbres phylogénétiques et la mise au point de sondes spécifiques de domaine, de groupe, de genre ou d'espèce (Amann *et al.* 1990a). Les sondes sont généralement longues de 15 à 20 nucléotides et peuvent être marquées avec un ou plusieurs fluorochromes ou avec des enzymes (Zarda *et al.* 1991). La détection des bactéries entières hybridées avec des sondes fluorescentes peut se faire en microscopie à épifluorescence (Manz *et al.* 1993) ou confocale (Manz *et al.* 1995) ainsi qu'en cytométrie de flux (Wallner *et al.* 1993). L'ARN peut aussi être extrait et l'hybridation réalisée sur membrane. L'ARNr 23S est aussi utilisé pour la mise au point de sondes mais le nombre de séquences disponibles dans les bases de données est nettement moins important que pour l'ARNr 16S. Une sonde spécifique du genre *Legionella* a été mise au point (Manz *et al.* 1995) ainsi qu'une sonde spécifique de l'espèce *L. pneumophila* (Grimm *et al.* 1998), toutes les deux ciblant l'ARNr 16S. Cette technique présente l'avantage de permettre l'observation des bactéries directement dans leur environnement, et de s'affranchir en partie du problème de la cultivabilité. Elle a été utilisée avec succès pour la détection dans des eaux de tours aéro-réfrigérantes après activation des légionelles par mise en présence de milieu nutritif afin d'augmenter l'activité métabolique, donc la quantité de ribosomes et d'ARNr. Dans la moitié des échantillons, les légionelles viables détectées par culture ne représentaient que 2% des légionelles détectées par la sonde spécifique de *L. pneumophila* (Wullings *et al.* 2002). Cependant le seuil de détection est élevé : environ 1 000 cellules cibles par litre, et l'observation peut être rendue difficile par la présence de particules auto-fluorescentes.

#### *I-2.1.2.c. Autres méthodes*

Des techniques de marquage avec des anticorps couplées à une révélation en fluorescence ont aussi été utilisées pour la détection dans l'environnement mais restent relativement anecdotiques (Rogers *et al.* 1992).

Des techniques émergentes font appel à la spectroscopie de Raman : les espèces ciblées sont immobilisées sur une puce grâce à des "biomolécules de capture", puis les cibles retenues sont examinées en spectroscopie de Raman ("micro Surface Enhanced Raman Scattering"), permettant une distinction d'espèce, voire même de souche. Par ailleurs cette technique semble pouvoir indiquer l'état de viabilité de la bactérie et peut aussi être utilisée pour la détection de toxines (Grow *et al.* 2003).

## **I-2.2. Diagnostic (Waterer *et al.* 2001; Jarraud, 2000; Fields *et al.* 2002)**

### I-2.2.1. Culture

La méthode de mise en culture des expectorations est sans doute la plus spécifique. Elle permet par ailleurs d'obtenir de nombreuses bactéries ce qui facilitera par la suite le typage moléculaire après extraction de l'ADN. Cependant tous les patients atteints de légionellose ne produisent pas d'expectorations purulentes, et beaucoup de laboratoires n'utilisent pas les milieux de culture spécifiques des légionelles en diagnostic de routine. La durée de survie (ou de cultivabilité) des légionelles dans les sécrétions respiratoires semble courte. La mise en culture des prélèvements doit donc être rapide, précédée éventuellement d'un prétraitement thermique ou acide qui améliore la sélectivité. La sensibilité de la technique varierait entre 20 et 80% suivant les auteurs. La coculture des prélèvements avec des amibes axéniques peut permettre d'isoler des légionelles dans un but diagnostique (La Scola *et al.* 2001b). Les légionelles peuvent aussi être isolées à partir du tissu pulmonaire, de lavages broncho-alvéolaires ou d'aspirations bronchiques. La détection par culture à partir de prélèvements extra-pulmonaires a aussi été rapportée lors d'atteintes cardiaques, digestives, rénales et cutanées.

### I-2.2.2. Immunofluorescence directe

La technique présente l'avantage d'être rapide, pouvant apporter une réponse dans des cas d'urgence. Cependant sa mise en œuvre nécessite un personnel très qualifié, habitué à interpréter les images observées. Elle est réalisée sur les mêmes types de prélèvements que ceux utilisés pour la culture, avec les mêmes limitations (pas d'expectorations chez certains patients). L'utilisation d'anticorps monoclonaux

est préférable à celle d'anticorps polyclonaux car elle diminue le risque de faux positifs. La sensibilité se situe entre 25 et 50%, la spécificité est d'environ 65%.

#### I-2.2.3. Détection des antigènes urinaires

Approximativement 80% des patients atteints de légionellose excrètent des antigènes solubles de *Legionella* dans leurs urines pendant le déroulement de l'infection. Ces antigènes sont détectables par méthode immuno-enzymatique (ELISA avec anticorps anti-LPS), radio-immunologique (RIA), ou par agglutination au latex. Il existe des réactions croisées avec les sérogroupes 4, 5 et 10 mais seule *L. pneumophila* séro groupe 1 est détectée en routine. La concentration des urines par ébullition ou ultrafiltration augmente la sensibilité qui se trouve habituellement aux alentours de 50% (spécificité : 99%). Les urines peuvent être conservées plusieurs mois à +4°C, ou congelées à -70°C pour une détection rétrospective des antigènes. Les avantages de cette méthode sont évidents : facilité de prélèvement des urines et rapidité du résultat. Mais elle a aussi des inconvénients : cinétique d'apparition et de disparition des antigènes variable suivant les patients pouvant conduire à de faux négatifs (apparition retardée) ou de faux positifs (excrétion prolongée), limitation à la détection d'antigènes issus de *L. pneumophila* séro groupe 1. La découverte récente de nouveaux antigènes urinaires pourrait permettre la mise au point de tests de détection plus sensibles et plus spécifiques (Kim *et al.* 2003).

#### I-2.2.4. Diagnostic sérologique : Immunofluorescence indirecte

C'est le test le plus utilisé pour le diagnostic. Il a été démontré récemment qu'il est plus sensible que certains tests ELISA (Malan *et al.* 2003). Les anticorps détectés par la réaction d'immunofluorescence indirecte sont en majorité dirigés contre le LPS. La cinétique d'apparition et la proportion des différents types d'immunoglobulines produites par les patients sont variables. Des cas d'absence de séroconversion malgré une légionellose avérée ont été rapportés, ainsi que des cas de séroconversion chez des patients transplantés, malgré l'absence de symptomatologie. La technique permet une détection des immunoglobulines totales, qui apparaissent le plus souvent une semaine après l'infection et dont le pic est maximal au bout de 3 à 4 semaines. De nombreuses réactions croisées ont été décrites avec les mycobactéries, les leptospires, *Chlamydia*, *Mycoplasma*,

*Citrobacter*, *Campylobacter*, et *Coxiella burnetii*. Ces réactions croisées ont également lieu entre les différents sérogroupes et entre les différentes espèces de *Legionella*.

#### I-2.2.5. Amplification génique

Les techniques de PCR déjà décrites ci-dessus pour la détection environnementale des légionelles sont également applicables au diagnostic clinique. Les avantages sont une rapidité de réponse diagnostique et une limite de détection basse. Les inconvénients sont la présence possible d'inhibiteurs de PCR pouvant conduire à un résultat faussement négatif, et le risque de contamination pouvant mener à de faux positifs.

### I-2.3. Typage

Le typage des espèces et des souches de légionelles isolées de l'environnement et chez les patients infectés est essentiel. Dans un contexte clinique et épidémiologique il permet de retracer l'origine de l'infection et d'isoler des souches virulentes. Dans un contexte environnemental il doit permettre de mieux comprendre la colonisation de certaines niches écologiques par certaines espèces et certaines souches. L'équipe du Centre National de Référence des Légionelles (Lyon) a ainsi mis en évidence la distribution endémique d'une même souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 en France. Cette souche, isolée à l'origine à Paris (Lawrence *et al.* 1999b), est responsable de 12,2% des cas de légionelloses en France, aussi bien d'origine communautaire que nosocomiale (Aurell *et al.* 2003). Elle serait aussi largement représentée dans d'autres pays européens. Les souches typées sont essentiellement d'origine clinique, on ne connaît donc pas l'importance de la distribution de cette souche dans l'environnement. Les raisons de cette prévalence importante restent à élucider et apporteront sans doute une meilleure compréhension de l'écologie de *L. pneumophila*.

### I-2.3.1. Discrimination des espèces et des sous-groupes

#### *I-2.3.1.a. Protéines totales et acides gras cellulaires*

L'extraction des protéines totales suivie d'une migration en gel SDS-Page et d'une analyse informatique des profils permet de distinguer la plupart des espèces (Verissimo *et al.* 1996). L'extraction des éthers d'acides gras cellulaires par saponification et méthylation est suivie d'une analyse par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Elle permet de distinguer les espèces du genre *Legionella* (Diogo *et al.* 1999).

#### *I-2.3.1.b. Polymorphisme des séquences des gènes mip, rpoB et dotA*

L'amplification de tout ou partie des gènes *mip* et *rpoB* (codant pour l'ARN polymérase) suivie d'un séquençage ou d'une digestion par des enzymes de restriction (RFLP) permet de distinguer les espèces du genre *Legionella* (Ratcliff *et al.* 1998; Ko *et al.* 2003). L'analyse des variations de séquence des gènes *rpoB* et *dotA* a par ailleurs permis de distinguer les différentes sous-populations clonales de *L. pneumophila* et de mettre en évidence des transferts génétiques qui ont sans doute joué un rôle important dans l'évolution de l'espèce (transfert des gènes codant pour les antigènes de surface déterminant l'appartenance au séro groupe 1) (Bumbaugh *et al.* 2002; Ko *et al.* 2002).

#### *I-2.3.1.c. Polymorphisme de longueur de l'espace intergénique de l'ADN de transfert (ADNt)*

Cette technique est basée sur une amplification des espaces intergéniques de l'ADNt à l'aide d'amorces consensus marquées par un fluorochrome. Les séquences ne varient parfois que de quelques paires de bases d'une espèce à l'autre. On effectue donc une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et un séquenceur détectera de manière continue et précise les variations d'intensité de fluorescence en sortie du gel de migration. L'analyse des courbes densitométriques obtenues grâce à un logiciel informatique permet une résolution, une reproductibilité et une rapidité d'exécution satisfaisantes (De Gheldre *et al.* 2001).

### I-2.3.2. Discrimination des souches

#### *I-2.3.2.a. Mobilité électrophorétique des enzymes (Selander et al. 1985)*

Dans cette technique un certain nombre d'enzymes métaboliques sont sélectionnées et on observe leur mobilité électrophorétique. Les variations alléliques des gènes correspondants se traduisent par des substitutions d'acides aminés qui modifient la charge globale des protéines et donc le profil électrophorétique. Les enzymes sont détectées grâce à des substrats spécifiques. Cette méthode est peu utilisée aujourd'hui car son pouvoir discriminant est insuffisant pour les études épidémiologiques

#### *I-2.3.2.b. Sérotypage*

Le sérotypage est un outil classique utilisé en diagnostic. Un certain nombre de kits commerciaux permettent de savoir si la bactérie appartient au genre *Legionella*, et, si c'est une *L. pneumophila*, à quel séro groupe elle appartient. Ces réactions ont permis de démontrer que le séro groupe 1 de l'espèce *L. pneumophila* est majoritairement impliqué dans les infections en Europe (Joseph 2002). Par ailleurs, des anticorps monoclonaux ciblant des épitopes associés au LPS de *L. pneumophila* séro groupe 1 permettent de subdiviser ce séro groupe en plusieurs sous-groupes monoclonaux (Helbig *et al.* 2002). Certains épitopes sont fréquemment retrouvés chez les souches virulentes. MAb 3/1 serait associé avec une hydrophobicité plus importante des souches, permettant une meilleure survie dans les aérosols. Les souches porteuses de cet épitope sont souvent retrouvées dans les cas de légionelloses communautaires. Dans le cas des légionelloses nosocomiales on retrouve des souches par ailleurs peu virulentes chez le patient en bonne santé : les patients hospitalisés constituent en effet une population plus sensible.

#### *I-2.3.2.c. ADN ribosomal*

Des techniques basées sur le polymorphisme des séquences d'ADN 16S et 23S et des séquences intergéniques 16S et 23S ont été développées, permettant de distinguer les différentes espèces de légionelles et les souches de *L. pneumophila* séro groupe 1. Le ribotypage consiste à digérer l'ADN total grâce à une enzyme de

restriction à sites fréquents (*EcoRI* par exemple), à le faire migrer et à le transférer sur membrane où il sera hybridé avec la séquence d'ARNr 16S d'*E. coli* marquée au phosphore 32 (sonde). La séquence d'ADN 16S présentant des *loci* hypervariables, les profils de digestion seront différents suivant les espèces (Van Belkum *et al.* 1996). L'utilisation simultanée de plusieurs sondes d'origines ribosomale et non ribosomale peut permettre une discrimination des souches de *L. pneumophila* séro-groupe 1 (Saunders *et al.* 1991). Les séquences intergéniques sont encore plus variables que l'ADN 16S ou 23S car, ne codant pour aucune fonction elles ne sont pas soumises aux pressions de sélection. Par ailleurs, la longueur de ces séquences peut varier d'un opéron ribosomal à l'autre (une même espèce bactérienne peut posséder jusqu'à 10 opérons ribosomaux). Des amorces universelles ciblant des séquences conservées des ADN 16S et 23S permettent l'amplification. L'amplification peut être suivie d'une digestion par une enzyme de restriction afin d'obtenir des profils encore plus spécifiques (Hookey *et al.* 1995; Fry *et al.* 1998; Riffard *et al.* 1998b). Ces techniques ne présentent pas toujours un pouvoir discriminant suffisant pour distinguer les souches d'une même espèce (Castellani Pastoris *et al.* 1997).

#### *I-2.3.2.d. Amplification aléatoire du chromosome : Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) et Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

Ces techniques consistent à utiliser des amorces ciblant des séquences consensus répétitives intergéniques. La longueur des amorces utilisées varie de 10 à 30 nucléotides, la différence entre AP-PCR et RAPD n'est pas très claire dans la littérature. Elles présentent un haut pouvoir discriminant à condition d'utiliser plusieurs amorces aléatoires simultanément (Lo Presti *et al.* 1998; Lawrence *et al.* 1999b). Elles sont très simples à mettre en œuvre : extraction de l'ADN suivie d'une PCR et d'une migration. Cependant la reproductibilité est médiocre, sans doute à cause du caractère aléatoire de l'hybridation qui est très sensible à la moindre variation dans les conditions expérimentales. Elles sont donc réservées à une utilisation intra-laboratoire, en prenant la précaution de normaliser les réactifs utilisés.

*I-2.3.2.e. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés : Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) et Infrequent Restriction Site PCR (IRS-PCR)*

Ce sont actuellement, avec l'électrophorèse en champs pulsés (PFGE), les techniques de référence pour le typage des souches de *Legionellae*. Elles présentent un pouvoir discriminant très élevé, comparable à la PFGE (décrite ci-dessous), mais sont nettement plus simples et plus économiques à mettre en œuvre. L'AFLP comporte une étape de digestion par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques de l'ADN génomique, suivie d'une PCR grâce à des amorces complémentaires des adaptateurs greffés aux sites de coupure. Les amorces peuvent être choisies pour être entièrement complémentaires des adaptateurs : tous les fragments coupés sont alors amplifiés, mais la stringence peut aussi être augmentée en ajoutant quelques nucléotides en 3' de l'amorce. L'IRS-PCR repose sur le même principe, mais on utilise une enzyme à site de coupure rare (*Xba*I) et une enzyme à site de coupure fréquent (*Pst*I). Les primers peuvent être marqués avec une molécule fluorescente, permettant l'analyse des fragments avec un séquenceur automatique. Une migration classique sur gel suivie d'une coloration au bromure d'éthidium peut aussi être réalisée. Les deux techniques ont été utilisées avec succès lors d'enquêtes épidémiologiques (Riffard *et al.* 1998a; Jonas *et al.* 2000). L'AFLP est la méthode de référence utilisée par le Groupe de Travail Européen sur les Infections à Légionelles (EWGLI) (Fry *et al.* 2000).

*I-2.3.2.f. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)*

Cette technique offre un pouvoir discriminant très élevé associé à une très bonne reproductibilité, mais sa mise en œuvre est coûteuse. Elle repose sur une digestion de l'ADN par des enzymes de restriction en 10 à 30 fragments, suivie d'une migration en gel d'agarose; le champ électrique est délivré en alternance par 3 groupes d'électrodes formant un hexagone. Cette technique a été utilisée avec succès dans de nombreuses études (Castellani Pastoris *et al.* 1997; Lawrence *et al.* 1999a; Rangel-Frausto *et al.* 1999), mais quelques travaux l'ont aussi remise en cause : l'hypothèse a notamment été formulée que la distribution des profils PFGE obtenus au sein de sous-types antigéniques n'était pas aléatoire (Drenning *et al.* 2001).



#### *I-2.3.2.g. Séquences intergéniques : variable-number tandem repeats (VNTRs)*

Le génome comporte des séquences intergéniques de 15 à 40 paires de bases répétées en nombres variables ("mini-satellites"). L'amplification grâce à des amorces complémentaires de ces séquences permet le typage des souches. Pourcel *et al.* ont utilisé 9 primers complémentaires de différentes séquences VNTRs et sont arrivés à une résolution comparable à celle obtenue avec la PFGE (Pourcel *et al.* 2003). Par ailleurs le séquençage systématique de certaines de ces séquences hypervariables pourrait apporter de nouvelles informations concernant la phylogénie des légionelles.

#### *I-2.3.2.h. Analyse de séquences*

La technique du Multi Locus Sequence Typing (MLST) consiste à sélectionner 7 "gènes de ménage" codant pour des enzymes dont l'activité est essentielle pour la survie des bactéries. Ces gènes sont séquencés en partie et les variations de séquences observées permettent la construction de dendogrammes. Cette technique est utile pour la visualisation de l'évolution des souches sur des périodes importantes, il peut y avoir des différences mineures (profils PFGE) entre des isolats identiques en MLST (Noller *et al.* 2003). Pour certaines espèces (*Vibrio cholerae*) la technique semble avoir un meilleur pouvoir discriminant que la PFGE (Kotetishvili *et al.* 2003).

### **I-3. ECOLOGIE DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA***

#### **I-3.1. Besoins nutritifs**

Bien que les besoins soient différents selon les espèces et les souches, l'arginine, la cystéine, la méthionine, la sérine, la thréonine et la valine sont nécessaires à tous les isolats, alors que d'autres souches nécessiteront en plus de la leucine, de l'isoleucine, de la phénylalanine et de la tyrosine pour leur croissance (George *et al.* 1980). Dans un milieu chimiquement défini, la concentration en acides aminés nécessaire à la croissance des légionelles est de 0,01% sauf pour la sérine (0,1%) et la cystéine (0,05%) (Pine *et al.* 1979). Dans le milieu BCYE liquide le

meilleur taux de croissance de *L. pneumophila* est obtenu avec une concentration de L-cystéine de 100 µg/mL. La proline, le glutamate et le glutathion sont aussi capables de stimuler la croissance de certaines souches (Ristroph *et al.* 1981). Le fer est un élément essentiel pour la virulence et la croissance extra- et intracellulaire des légionelles (James *et al.* 1995; Hickey *et al.* 1997). Il est utilisé comme cofacteur d'enzymes (aconitase, superoxyde dismutase, ...). En règle générale, les bactéries Gram - ont besoin de 0,3 à 1,8 µM de fer pour leur croissance (James *et al.* 1995) tandis que *L. pneumophila* requiert 3 à 13 µM (Johnson *et al.* 1991). De faibles quantités (1 mg/L) de magnésium, zinc et vanadium stimulent la croissance des légionelles en milieu liquide (Reeves *et al.* 1981) et de fortes concentrations (10-100 mg/L) de cuivre, manganèse et zinc sont toxiques (States *et al.* 1985). Des souches de *L. pneumophila* cultivées sur milieux synthétiques riches accumulent des réserves nutritives sous forme de granules intracytoplasmiques de polyhydroxybutyrate (PHB), qui sont ensuite consommés durant l'incubation des bactéries en milieu pauvre (eau du robinet). La cultivabilité semble liée aux réserves de PHB : quand celles-ci disparaissent, la cultivabilité décroît rapidement (James *et al.* 1999). L'équipe de Inoue *et al.* suggère que durant sa croissance *L. pneumophila* pourrait produire du soufre, qui a un effet bactéricide et qui entraînerait un ralentissement de la croissance. Le charbon actif ajouté au milieu BCYE permettrait la fixation de ce soufre et donc une meilleure croissance des légionelles (Inoue *et al.* 2002).

### I-3.2. Présence dans l'environnement

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement. Elles sont retrouvées par culture à partir de 40% des prélèvements réalisés dans les eaux de surface tandis que l'utilisation d'anticorps spécifiques ou de la PCR permet une détection dans plus de 80% des prélèvements (Lye *et al.* 1996; Fields 1997). L'espèce *Legionella longbeachae* est fréquemment isolée à partir de terreaux utilisés pour le jardinage et serait responsable de 50% des cas de légionellose en Australie (Steele *et al.* 1990; Surman *et al.* 2002). Les légionelles peuvent survivre dans l'eau dans des gammes de températures de 4 à 60°C, entre des pH de 5,0 à 8,5, avec une concentration de plus de 3% de NaCl et une concentration en oxygène dissous de 0,2 à 15 ppm (Nguyen *et al.* 1991). *L. pneumophila* est capable de croître entre 20°C et 42°C, avec une température optimale à 35°C, et ne se multiplie qu'en présence

d'hôtes eucaryotes ou au sein de biofilms complexes (Surman *et al.* 2002). Les systèmes hydriques artificiels dans lesquels les légionelles ont été isolées sont nombreux et variés : réseaux internes de distribution d'eau avec une prédilection pour les chauffe-eau (Wadowsky *et al.* 1982; Stout *et al.* 1985; Alary *et al.* 1992; Lin *et al.* 1998), bains bouillonnants (Luttichau *et al.* 1998), piscines thermales (Miyamoto *et al.* 1997a), systèmes de climatisation et tours aéro-réfrigérantes (Gorman *et al.* 1985; Castellani Pastoris *et al.* 1997; Brown *et al.* 1999; Ishimatsu *et al.* 2001), fontaines décoratives (Heng *et al.* 1997), systèmes d'arrosage, équipements de thérapie respiratoire et dentaire (Yu 1993; Atlas *et al.* 1995; Zanetti *et al.* 2000), ... Des études menées en France en 2000 sur la prévalence des *Legionella* dans les réseaux d'eau des établissements recevant du public et des établissements de santé ont montré que 42% avaient au moins une analyse positive, avec 16% des résultats d'analyses supérieurs à  $10^3$  UFC/L. De même, une enquête menée sur 70 tours aéro-réfrigérantes à Paris entre 1995 et 1999 par le Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris a mis en évidence que 75% des équipements contrôlés présentaient des concentrations égales ou supérieures à 100 UFC/L (20% entre  $10^2$  et  $10^3$  UFC/L, 30% entre  $10^3$  et  $10^5$  UFC/L et 25% supérieurs à  $10^5$  UFC/L) (CSHP 2001).

### **I-3.3. Interactions connues avec d'autres espèces bactériennes**

Il a été décrit dans la littérature un certain nombre d'interactions avec d'autres espèces bactériennes qui potentialiseraient ou au contraire inhiberaient la croissance (Tab. IV).

#### **I-3.3.1. Inhibition**

L'inhibition peut être due à la synthèse d'un métabolite bactéricide et/ou bactériostatique (amensalisme), à la consommation d'un nutriment nécessaire à la légionelle (compétition) ou encore à une activité prédatrice vis-à-vis de la légionelle (parasitisme).

Tableau IV : Interactions connues des légionelles avec d'autres espèces procaryotes

Organismes	Type d'interaction	Référence
Cyanobactéries	<i>Fisherella</i> spp.	association (Tison <i>et al.</i> 1980)
	<i>Oscillatoria</i> spp.	association (Tison <i>et al.</i> 1980)
	<i>Phormidium</i> spp.	association (Tison <i>et al.</i> 1980)
Bactéries	<i>Acinetobacter</i> spp.	synergie (Lee <i>et al.</i> 1991)
	<i>Aeromonas</i> spp.	inhibition (Gomez-Lus <i>et al.</i> 1993)
	<i>Alcaligenes</i> spp.	synergie (Lee <i>et al.</i> 1991)
	<i>Bacillus</i> spp.	inhibition (Carrington 1979)
	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	parasitisme (Tomov <i>et al.</i> 1982)
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	synergie (Koide <i>et al.</i> 1989)
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	inhibition (Toze <i>et al.</i> 1990)
	<i>Citrobacter</i> spp.	inhibition (Gomez-Lus <i>et al.</i> 1993)
	<i>Enterobacter</i> spp.	inhibition (Gomez-Lus <i>et al.</i> 1993)
	<i>Escherichia</i> spp.	inhibition (Gomez-Lus <i>et al.</i> 1993)
	<i>Flavobacterium breve</i>	synergie (Grimm 2000)
	<i>Flavobacterium</i> spp.	synergie (Stout <i>et al.</i> 1985)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	inhibition (Gomez-Lus <i>et al.</i> 1993)
	<i>Proteus</i> spp.	inhibition (Gomez-Lus <i>et al.</i> 1993)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	synergie (Fliermans 1996)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	inhibition (Rowbotham 1986)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	synergie (Stout <i>et al.</i> 1985)
	<i>Salmonella</i> spp.	inhibition (Gomez-Lus <i>et al.</i> 1993)
	<i>Serratia</i> spp.	inhibition (Gomez-Lus <i>et al.</i> 1993)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	inhibition (Carrington 1979)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	inhibition (Flesher <i>et al.</i> 1980)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	inhibition (Carrington 1979)	
<i>Streptococcus</i> spp.	inhibition (Flesher <i>et al.</i> 1980)	
<i>Vibrio fluvialis</i>	inhibition <sup>a</sup> (Toze <i>et al.</i> 1990)	

<sup>a</sup> Excepté *L. pneumophila*

#### I-3.3.1.a. Inhibition par compétition ou bactéricidie

Toze *et al.* (Toze *et al.* 1990) ont isolé 100 espèces bactériennes à partir de différents réseaux d'eau potable et ont déterminé leur capacité à inhiber la croissance de plusieurs espèces de légionelles sur gélose BCYE standard ou sur gélose UNBCYE sans L-cystéine ni alpha-cétoglutarate et seulement 0,001% de fer (contre 0,025% en BCYE). Sur les 100 espèces testées, 15 à 30% étaient inhibitrices de la croissance d'une des espèces de légionelles, six parmi elles étaient des Gram+. Les dix espèces appartenant au genre *Aeromonas* ainsi qu'un *Brevundimonas vesicularis* étaient inhibiteurs pour toutes les espèces, tandis qu'un *Vibrio fluvialis* inhibait toutes les légionelles sauf *L. pneumophila*. De manière surprenante, deux espèces qui n'ont pas pu être identifiées étaient inhibitrices sur BCYE, alors qu'elles étaient potentialisatrices sur UNBCYE : les auteurs formulent l'hypothèse que ces deux espèces ont besoin de L-cystéine pour synthétiser un métabolite inhibiteur. Des études fondées sur les mêmes expérimentations ont montré que *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus* spp. et les streptocoques du groupe viridans étaient capables d'inhiber la croissance de *L. pneumophila* (Carrington 1979). Zanetti a mis en évidence une corrélation inverse entre la quantité de bactéries hétérotrophes (*P. aeruginosa* en majorité) et celle de *L. pneumophila* dans les circuits d'eau des équipements de dentiste (Zanetti *et al.* 2000).

#### I-3.3.1.b. Parasitisme

Le seul parasite identifié des légionelles est l'espèce *Bdellovibrio bacteriovorus* (Tomov *et al.* 1982). Cette bactérie est présente dans les sols et les eaux contaminées. Différentes espèces bactériennes peuvent être parasitées : *Escherichia coli* (Jackson *et al.* 1992), *Salmonella* (Fratamico *et al.* 1996), ... Après attachement et pénétration dans la bactérie cible, elle se multiplie lentement entre la paroi et la membrane cytoplasmique ("bdellokyste"), et finit par être libérée dans l'environnement par éclatement de la cellule parasitée. Une étude menée par Richardson a prouvé que des *Bdellovibrio* présents dans les réseaux d'eau sont capables de parasiter les légionelles (Richardson 1990). Par ailleurs l'auteur rapporte

d'autres études dans lesquelles il a été démontré que les *Bdellovibrio* présentent un chimiotactisme vis-à-vis du fer et de la cystéine.

### I-3.3.2. Potentialisation

#### I-3.3.2.a. Bactéries

Les espèces décrites comme potentialisant la croissance des légionelles ont aussi été découvertes grâce à des essais de coculture sur gélose BCYE sans L-cystéine. De petites colonies de légionelles apparaissent autour des colonies de l'espèce potentialisatrice ("satellitisme"). Une souche de *Flavobacterium breve*, isolée à partir d'un ballon d'eau chaude contaminé par *L. pneumophila*, a permis la croissance de plusieurs espèces de légionelles sur gélose UNBCYE (Wadowsky *et al.* 1983). Des espèces appartenant à ce genre bactérien sont d'ailleurs capables de synthétiser la L-cystéine (Muller *et al.* 1996). Une étude semblable menée par Stout *et al.* a permis de mettre en évidence un satellitisme autour de bactéries appartenant aux genres *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Acinetobacter* et des espèces non identifiées. Par ailleurs les auteurs ont fait un essai de coculture *L. pneumophila* + *Pseudomonas* spp. en bouillon nutritif ne contenant pas de L-cystéine ou d'alpha-cétoglutarate. Ils ont pu observer une croissance de *L. pneumophila* conjointement à celle du *Pseudomonas*, suivie d'une diminution de la quantité de légionelles, alors que seule dans le milieu nutritif la légionelle décroît très rapidement (Stout *et al.* 1985). L'espèce *Brevundimonas vesicularis* (souche environnementale et souche ATCC11426) a aussi été décrite comme permettant la croissance satellitaire de *L. pneumophila* sur milieu UNBCYE (Koide *et al.* 1989). Curieusement, dans leur étude décrite ci-dessus Toze *et al.* ont rapporté cette même espèce comme étant inhibitrice de la croissance de plusieurs espèces de légionelles, y compris *L. pneumophila*, aussi bien sur BCYE que sur UNBCYE. Le caractère inhibiteur/potentialisateur pourrait être dépendant des souches en présence, ainsi que du nombre de repiquages sur milieu synthétique avant le test de co-incubation (Wadowsky *et al.* 1985). Des essais ont été menés par l'équipe de Surman pour essayer de prouver que *L. pneumophila* peut se multiplier dans les réseaux en l'absence de protozoaires. Les auteurs ont inoculé un circuit de recirculation d'eau contenant un biofilm composé notamment de *Pseudomonas*, *Flavobacterium*,

*Methylobacterium*, *Acinetobacter* et *Alcaligenes* spp., avec une souche de *L. pneumophila* dérivée de la souche virulente Corby mais incapable de se multiplier dans les cellules eucaryotes (Surman *et al.* 2002). Par ailleurs, afin de s'assurer de l'absence de protozoaires dans leur système ils y ont ajouté du cycloheximide, poison connu pour inhiber la division des eucaryotes sans effet notable sur les procaryotes. Ils ont pu observer une légère croissance des légionelles planctoniques et des légionelles du biofilm après ajout de cycloheximide, suivie d'une persistance des légionelles pendant plusieurs jours. La conclusion donnée est que «la croissance intracellulaire n'est pas essentielle pour la prolifération des *Legionella* au sein d'une communauté complexe de micro-organismes». Des essais semblables menés par Murga *et al.* avec des biofilms beaucoup plus simples puisque composés de 3 espèces bactériennes seulement (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et un *Flavobacterium* spp.), ont montré que *L. pneumophila* était incapable de se multiplier dans le biofilm en l'absence d'amibe mais qu'elle pouvait y persister à l'état viable durant des périodes importantes (Murga *et al.* 2001).

#### *I-3.3.2.b. Cyanobactéries*

Des cyanobactéries appartenant aux genres *Fisherella* spp., *Oscillatoria* spp. et *Phormidium* spp. sont capables de fournir les nutriments nécessaires à la croissance extracellulaire des légionelles dans l'environnement (Tison *et al.* 1980). Par ailleurs, les légionelles en suspension dans un surnageant de culture de *Fisherella* spp. survivent mieux dans les aérosols que si elles sont en suspension dans un tampon salin (Berendt 1981). La dialyse du surnageant entraîne une disparition de cet effet stabilisateur, les molécules impliquées seraient donc de faible poids moléculaire. Enfin, il a été démontré que *L. pneumophila* adhère de manière non spécifique à *Fisherella* spp., ce qui lui permettrait de rester à proximité de cette source de nutriments (Bohach *et al.* 1983). Cette association avec les cyanobactéries peut avoir une grande importance écologique dans les environnements naturels car celles-ci sont capables de proliférer en grandes quantités ("blooms") dans les bassins d'eau stagnante, libérant ainsi de grandes quantités de métabolites potentiellement utilisables par les légionelles.

### I-3.4. Interactions connues avec des espèces eucaryotes

De nombreuses espèces de protozoaires peuvent servir d'hôte aux légionelles. Une revue attentive de la littérature nous a permis d'en dénombrer 24 (Tab. V), liste qui se verra sans doute allongée dans les années qui viennent.

**Tableau V : Interactions connues des légionelles avec des espèces eucaryotes**

Organismes		Référence
Algues vertes (association)	<i>Chlorella</i> spp.	(Steinert 1996)
	<i>Gleocystis</i> spp.	(Steinert 1996)
	<i>Scenedesmus</i> spp.	(Steinert 1996)
Amibes	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	(Holden <i>et al.</i> 1984)
	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	(Fields 1993)
	<i>Acanthamoeba griffini</i>	(Jaulhac <i>et al.</i> 1993)
	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	(Tyndall <i>et al.</i> 1993)
	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	(Anand <i>et al.</i> 1983)
	<i>Acanthamoeba royreba</i>	(Tyndall <i>et al.</i> 1982)
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	(Kilvington <i>et al.</i> 1990)
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	(Hagele <i>et al.</i> 2000)
	<i>Echinamoeba exudans</i>	(Fields <i>et al.</i> 1990)
	<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	(Rowbotham 1986)
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	(Wadowsky <i>et al.</i> 1988)
	<i>Naegleria australiensis</i>	(Harf <i>et al.</i> 1988)
	<i>Naegleria fowleri</i>	(Newsome <i>et al.</i> 1985)
	<i>Naegleria jadini</i>	(Rowbotham 1980b)
	<i>Naegleria lovaniensis</i>	(Tyndall <i>et al.</i> 1982)
	<i>Naegleria gruberi</i>	(Rowbotham 1980b)
	<i>Platyamoeba placida</i>	(Kuroki <i>et al.</i> 1998b)
	<i>Saccamoeba</i> spp	(Rohr <i>et al.</i> 1998)
	<i>Vahlkampfia jugosa</i>	(Rowbotham 1986)
	<i>Vexillifera</i> spp.	(Kuroki <i>et al.</i> 1998a)
<i>Willaertia</i>	(Molmeret 2001)	
Ciliés	<i>Cyclidium</i> spp.	(Barbaree <i>et al.</i> 1986)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	(Fields <i>et al.</i> 1984)
	<i>Tetrahymena vorax</i>	(Smith-Somerville <i>et al.</i> 1991)



Le processus de phagocytose des bactéries permet en temps normal aux amibes de se nourrir. Les amibes "broutent" la surface des biofilms bactériens. Dans le cas des légionelles, ce processus peut conduire à une multiplication intracellulaire aboutissant à la libération de nombreuses bactéries.

Beaucoup d'auteurs suggèrent que les légionelles ne peuvent se répliquer dans les réseaux qu'à l'intérieur des protozoaires et avancent que même si les nutriments indispensables à leur croissance peuvent être réunis dans une même niche écologique, il est probable que celle-ci soit colonisée par des bactéries à croissance rapide qui ne permettront pas le développement des légionelles (Fields *et al.* 2002).

Plusieurs faits viennent supporter l'hypothèse d'une croissance intracellulaire obligatoire (d'après Abu Kwaik *et al.* (Abu Kwaik *et al.* 1998b)) :

- Beaucoup de protozoaires supportent la multiplication intracellulaire,
- Lors d'épidémies de légionellose, les amibes sont isolées à partir des sources d'infection et elles supportent la croissance des légionelles (Barbaree *et al.* 1986; Nahapetian *et al.* 1991),
- Après la croissance intraprotazoaire les légionelles sont beaucoup plus résistantes à des conditions environnementales défavorables telles qu'une température ou une osmolarité élevées, l'acidité, mais aussi aux traitements chimiques de désinfection (Barker *et al.* 1992) et aux antibiotiques (Barker *et al.* 1995),
- Les bactéries intraprotazoaires sont beaucoup plus résistantes aux désinfections chimiques et aux biocides (Kilvington *et al.* 1990),
- Les *Acanthamoebae* peuvent sécréter des vésicules de taille respirable contenant de nombreuses légionelles. Ces vésicules sont résistantes à des cycles de congélation-décongélation ainsi qu'aux ultrasons et les bactéries y sont protégées de l'action des biocides (Berk *et al.* 1998),
- La multiplication intra-amibienne entraîne une activation de la virulence vis-à-vis des macrophages et des cellules épithéliales. Ainsi *L. pneumophila* cultivée dans *A. castellanii* devient 100 fois plus virulente vis-à-vis des cellules

épithéliales et 10 fois plus vis-à-vis des macrophages que la même souche cultivée sur gélose (Cirillo *et al.* 1994),

- Brieland a montré que la particule infectieuse pouvait être constituée par *H. vermiformis* infectée par *L. pneumophila*, et que dans ce cas l'infection était plus sévère que si l'on inoculait les deux espèces séparément (Brieland *et al.* 1997a; Brieland *et al.* 1997b),
- Le nombre de légionelles isolées à partir de la source d'infection étant généralement faible, il serait compensé par une infectiosité beaucoup plus élevée des bactéries (O'Brien *et al.* 1993),
- Les légionelles à l'état viable mais non cultivable peuvent être ressuscitées par coculture amibienne (Steinert *et al.* 1997),
- Il n'a jamais été rapporté de cas de contamination inter-humaine, la seule source de contamination connue est constituée par les aérosols artificiels produits par de nombreux dispositifs.

#### I-3.4.1. Amibes

Les genres amibiens dont l'interaction avec les légionelles a été étudiée en détail sont *Acanthamoeba* et *Hartmannella*, les espèces types étant représentées par *Acanthamoeba castellanii* et *Hartmannella vermiformis*. La multiplication dans ces amibes est très efficace puisqu'une seule amibe infectée peut libérer plusieurs centaines de légionelles. Les légionelles sont capables de survivre dans les kystes d'*Acanthamoeba*, à l'intérieur desquels elles sont protégées vis-à-vis de conditions environnementales défavorables (Kilvington *et al.* 1990). Elles sont beaucoup plus rarement retrouvées dans les kystes d'*Hartmannella*, dans lesquels elles sont localisées au niveau de la paroi (Greub *et al.* 2003). Neumeister *et al.* ont rapporté une répllication intracellulaire améliorée dans les cellules Mono Mac 6 (cellules macrophagiques humaines) des espèces *L. gormanii*, *L. micdadei*, *L. steigerwaltii*, *L. longbeachae*, et *L. dumoffii* en présence d'*A. castellanii* (Neumeister *et al.* 2000). Cette amélioration n'est pas observée si les légionelles proviennent directement d'amibes infectées. Les auteurs suggèrent que des molécules sécrétées par les amibes seraient impliquées dans ce phénomène.

Le genre *Naegleria*, lui aussi très répandu dans les eaux de surface, comprend plusieurs espèces pouvant supporter la multiplication des légionelles. Les

autres espèces décrites appartiennent aux genres *Vahlkampfia*, *Platyamoeba*, *Saccamoeba*, *Vexilliferia*, *Echinamoeba* et *Willaertia*. Molmeret *et al.* ont montré que cette dernière espèce présente la capacité de phagocyter des amibes appartenant au genre *Hartmannella*, et que si celles-ci sont infectées par des légionelles l'infection sera transmise à *Willaertia* spp. : les légionelles survivent donc aux deux phagocytoses successives (Molmeret 2001).

#### I-3.4.2. Ciliés

Trois espèces de ciliés peuvent être infectées par les légionelles : *Cyclidium* sp., *Tetrahymena pyriformis* et *Tetrahymena vorax* (Barbaree *et al.* 1986 ; Smith-Somerville *et al.* 1991; Steele *et al.* 1996 ). Les espèces du genre *Tetrahymena* semblent plutôt retrouvées dans des eaux relativement froides (tours aéro-réfrigérantes). *T. pyriformis* a été décrit comme permettant la croissance à 30°C de *L. longbeachae*, de *L. bozemanii*, et de plusieurs souches de *L. anisa*, alors que la multiplication d'une souche de *L. pneumophila* séro-groupe 1 était beaucoup moins efficace et que toutes les souches de *L. micdadei* et la souche *L. anisa* ATCC 35292 étaient incapables de se multiplier (Steele *et al.* 1996). A 35°C la croissance de *L. pneumophila* (souche identique ?) dans le cilié semble plus efficace puisque la population de légionelles augmente de 2 à 3 logarithmes en 7 jours (Fields *et al.* 1984). *T. vorax* permet la survie de *L. pneumophila* à 20°C dans des vacuoles de phagocytose (Smith-Somerville *et al.* 1991). McNealy *et al.* ont montré qu'un *Tetrahymena* spp. était capable de concentrer et de relarguer dans des vésicules les légionelles issues d'une multiplication intra-amibienne (McNealy *et al.* 2002). Par ailleurs les auteurs ont aussi montré que les légionelles présentes en quantités beaucoup moins importantes que celles utilisées lors des tests d'invasion en laboratoire, à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 légionelle pour 1 000 amibes contre quelques dizaines par amibe, sont tout aussi capables d'initier l'infection du cilié de manière très efficace, et que cette infection n'est pas modifiée par la présence d'une flore annexe importante ou par l'ajout de *L. pneumophila* tuées.

#### I-3.4.3. *Dictyostelium discoideum*

L'espèce *Dictyostelium discoideum* peut aussi servir d'hôte à *L. pneumophila*. Cette amibe très particulière se nourrit de bactéries grâce à des mécanismes de

phagocytose et de macropinocytose qui ont été largement étudiés (Rupper *et al.* 2001). Si les nutriments viennent à manquer, les amibes peuvent s'agréger et se différencier en éléments pluricellulaires ("fruiting bodies") portant des spores matures. C'est un organisme ubiquitaire du sol. Il présente un génome haploïde, donc facilement manipulable, qui de plus est séquencé. Par ailleurs on dispose de marqueurs cellulaires et les voies de signalisation sont connues. Toutes ces raisons en font un bon modèle pour l'étude du cycle intracellulaire de *L. pneumophila* (Hagele *et al.* 2000; Solomon *et al.* 2000).

#### I-3.4.4. Algues vertes

Des interactions (association) ont aussi été décrites avec des algues vertes : *Chlorella* spp., *Gleocystis* spp. et *Scenedesmus* spp. Il semblerait que celles-ci sécrètent des métabolites utiles à la croissance des légionelles. Signalons que ces algues sont notamment capables de concentrer les métaux (Lawrence *et al.* 1998).

#### I-3.5. Phages

Curieusement, aucun phage capable d'infecter *L. pneumophila* n'a encore été isolé de l'environnement malgré les recherches systématiques menées par certains auteurs (Mintz 1999).

## **II – FLORE DES RESEAUX**

D'un point de vue historique, la microbiologie des réseaux de distribution d'eau n'a principalement été étudiée que dans une perspective de santé publique. Bien que l'eau potable soit l'un des aliments les plus surveillés, les épidémies de plus ou moins grande ampleur dues à des pathogènes présents dans les réseaux sont récurrentes, quel que soit le niveau d'industrialisation du pays (Schoenen 2002). Dès les années 20 il a été prouvé que la quantité de bactéries augmente durant le transport dans le réseau de distribution, et que la qualité de l'eau dépend non seulement de la source et du traitement de potabilisation utilisés, mais aussi du réseau de distribution lui-même (Olson *et al.* 1984). Les recherches conduites ensuite ont montré que les coliformes sont capables de survivre à la chloration (instaurée dans les réseaux au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Schoenen 2002) dans le système de distribution et de recontaminer le réseau à partir de différents points d'entrée.

L'eau potable des réseaux est un système aquatique oligotrophique : la croissance microbiologique est limitée par de faibles quantités de nutriments (carbone organique assimilable, phosphore, ...). Cette croissance intervient en grande majorité à l'interface eau-canalisation, très peu dans l'eau circulante. La microflore est complexe, composée de bactéries mais aussi de protozoaires, de levures, de champignons et d'algues (Sibille 1998). Il semble aujourd'hui difficile d'évoquer l'existence d'une flore autochtone type des réseaux de distribution d'eau potable. D'une part il est certain que la composition de la flore varie en fonction de nombreux critères physiques, chimiques et biologiques. D'autre part les études décrivant ces flores sont encore peu nombreuses comparativement à la variété importante des paramètres qui ne sont pas constants d'un réseau à un autre. De plus les études menées emploient différentes techniques : culture, utilisation de sondes, PCR suivie de clonage et séquençage, ... Ces techniques ont chacune leurs limites et apportent des biais, conduisant à la surestimation ou au contraire à la sous-estimation de certaines espèces. Les résultats de ces études sont donc difficilement comparables.

## II-1. BACTERIES

### II-1.1. Groupes et genres bactériens détectés dans les réseaux d'eau potable

#### II-1.1.1. Détection par culture

Dans sa revue (Sibille 1998) Sibille fait état d'une densité de cellules bactériennes dénombrées dans l'eau par comptage en microscopie à épifluorescence (bactéries vivantes et mortes) variant de  $10^3$  à  $10^6$  cellules / mL, la fraction cultivable étant inférieure à 0,5%. La densité des bactéries du biofilm varierait entre  $10^6$  et  $10^7$  cellules / cm<sup>2</sup>, avec une fraction cultivable de 6 à 9%. Dans cette même revue l'auteur rapporte diverses études de la composition de la flore bactérienne des réseaux de distribution chlorés. Les genres identifiés sont principalement *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (groupe des gamma-Proteobacteria), *Flavobacterium* (groupe des *Flavobacterium-Cytophaga*), *Bacillus*, *Sarcina*, *Staphylococcus* (*Firmicutes*) et *Corynebacterium* (*Actinobacteria*).

Rogers *et al.* ont utilisé une flore complexe provenant d'un ballon d'eau chaude contaminé par *L. pneumophila* pour inoculer un circuit reproduisant un réseau d'eau potable dans lequel ils avaient implantés différents types de supports afin d'étudier la cinétique de formation des biofilms (Rogers *et al.* 1994). Les supports les plus contaminés étaient le latex et un copolymère d'éthylène-propylène suivis par le polyéthylène et les alliages métalliques. La population bactérienne était essentiellement constituée d'espèces appartenant aux genres *Alcaligenes*, *Methylobacterium* (beta-Proteobacteria), *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* (gamma-Proteobacteria), *Flavobacterium* (*Flavobacterium-Cytophaga*) et *Actinomycetes* (*Actinobacteria*). Les *L. pneumophila* dénombrées dans les biofilms représentaient 0,25 à 5% de la flore totale en fonction du support. La moisissure *Aspergillus* était aussi retrouvée.

Une étude a été menée par Tall *et al.* pour étudier la cinétique de colonisation des circuits d'eau des équipements de fauteuils dentaires (Tall *et al.* 1995). Elle a mis en évidence une évolution de la flore : d'abord majoritairement composée de *Pseudomonas* spp. avec aussi des bactéries des genres *Pasteurella*, *Moraxella*,

*Aeromonas* spp. (gamma-*Proteobacteria*) et *Ochrobactrum* (alpha-*Proteobacteria*), elle se voyait plus tard complétée par des *Flavobacterium* et des *Acinetobacter* spp.

#### II-1.1.2. Détection par des sondes ciblant l'ARNr

Les études moléculaires menées par Kalmbach *et al.* grâce à des sondes ciblant l'ARN ribosomal ont démontré que les bactéries appartenant à la classe des beta-*Proteobacteria* étaient largement majoritaires dans quatre réseaux de distribution différents. Ces réseaux étaient alimentés par des eaux de surface ou des eaux souterraines qui avaient subi différents traitements de potabilisation (Kalmbach *et al.* 1997; Kalmbach *et al.* 2000). Après 35 à 70 jours d'exposition, environ 50% des bactéries marquées au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) étaient hybridées avec la sonde universelle EUB338. 34 à 36% étaient hybridées avec la sonde Bet42a spécifique des beta-*Proteobacteria* et 2 à 6% avec la sonde Gam42a spécifique des gamma-*Proteobacteria*. Les pourcentages de bactéries hybridées avec la sonde Alf1b spécifique des alpha-*Proteobacteria* étaient de 11, 5 et 3% après 35, 56 et 70 jours d'exposition. Ces études ont conduit à la définition par l'auteur d'un nouveau genre bactérien : *Aquabacterium*, et de trois espèces : *A. citratiphilum*, *A. parvum* et *A. commune*. Le genre *Aquabacterium* était très largement représenté parmi les beta-*Proteobacteria*, l'espèce *A. commune* représentant 30 à 50% de la flore totale dans les quatre réseaux étudiés. Cette répartition restait relativement constante quel que soit le type de support utilisé pour prélever les biofilms (verre, polyéthylène de haute ou de basse densité, polychlorure de vinyle), et variait peu au cours du temps. Les auteurs n'ont pu observer des légionelles révélées par la sonde LEG705 que dans des protozoaires broutant la surface des biofilms. Le signal fluorescent était important, signe d'une activité métabolique importante des bactéries.

Une étude menée par Schwartz *et al.* (Schwartz *et al.* 1998) sur des biofilms prélevés dans des réseaux de distribution d'eau potabilisée par filtration a mis en évidence une composition des biofilms légèrement différente. Les beta-*Proteobacteria* étaient toujours nombreuses et généralement majoritaires : 35 à 70% des bactéries marquées au DAPI. En revanche, les gamma-*Proteobacteria* représentaient aussi une part importante de la flore : 10 à 40% des cellules marquées au DAPI. Les alpha-*Proteobacteria* représentaient 4 à 23 % des cellules. L'hybridation avec la sonde universelle EUB338 n'a pas été réalisée. L'influence du

support utilisé pour le développement des biofilms était plus marquée que dans l'étude de Kalmbach *et al.* Cependant les résultats sont difficilement comparables car les biofilms étaient prélevés après seulement quatre jours d'exposition. En effet, au-delà de sept jours d'incubation les auteurs observaient une diminution importante de l'efficacité de l'hybridation. Les auteurs rapportent une proportion de légionelles détectées par la sonde LEG705 atteignant jusqu'à 7% de la flore totale dans certains biofilms.

### II-1.1.3. Détection par analyse de l'ADN

Une technique couramment utilisée pour analyser la composition de flores microbiennes complexes consiste à construire des bibliothèques de clones dans lesquels ont été insérés des fragments d'ADN 16S amplifiés à partir d'extraits d'ADN totaux. En utilisant cette technique, Schmeisser *et al.* ont pu mettre en évidence une large prédominance des bactéries appartenant au groupe des *Proteobacteria* dans des biofilms issus de réseaux d'eau potable (Schmeisser *et al.* 2003). Sur 81 clones différents analysés, 23, 29, 15 et 3% appartenaient aux  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, et  $\delta$ -*Proteobacteria*, respectivement. Par ailleurs, le clonage aléatoire et le séquençage de 2 500 inserts de 1 à 5 kb a permis de mettre en évidence une grande diversité des gènes provenant du biofilm. De nombreux gènes codant pour des fonctions cataboliques et métaboliques ont été identifiés : gènes codant pour des lipases, pour des enzymes permettant la dégradation de composés aromatiques, pour la dégradation ou la modification de polysaccharides, pour le catabolisme des acides aminés, ... 2,1% des gènes identifiés codaient pour des mécanismes de résistance aux antibiotiques ou de détoxification des métaux.

La technique de T-RFLP est aussi couramment utilisée pour caractériser les flores d'écosystèmes complexes. Elle consiste en une amplification par clonage de l'ADN 16S, suivie d'une digestion par des enzymes de restriction et d'une migration sur gel. Martiny *et al.* (2003) ont utilisé cette technique couplée à un séquençage de 228 des fragments amplifiés afin d'étudier la diversité des populations des biofilms issus d'un pilote reproduisant un réseau d'eau potable non traitée (Martiny *et al.* 2003). Des bactéries appartenant au genre *Nitrospira* ainsi qu'aux genres *Aquabacterium*, *Sphingomonas* et *Pseudomonas* faisaient partie des premières espèces colonisatrices. Après huit à neuf mois, *Nitrospira* représentait une part très



importante (78%) des espèces retrouvées dans les biofilms, puis céda progressivement la place à d'autres espèces. Le biofilm mature (> 500 j) était caractérisé par une grande variété d'espèces incluant notamment des *Nitrospira*, des *Planctomyces*, des *Acidobacterium* et des *Pseudomonas*.

La même démarche méthodologique a été adoptée par Regan *et al.* pour mettre en évidence l'effet d'un traitement de l'eau potable à la chloramine (Regan *et al.* 2002; Regan *et al.* 2003). Celle-ci introduit de l'ammoniaque dans les réseaux, qui est utilisé par les bactéries oxydant l'ammoniaque (AOB, genres *Nitrosomonas* et *Nitrosospira*, beta-*Proteobacteria*) qui produisent en retour des nitrites et des composés organiques solubles. La biomasse augmente, entraînant une demande accrue en chloramine qui finit par ne plus être présente en quantité suffisamment importante pour empêcher la croissance de bactéries oxydant les nitrites (NOB, genres *Nitrobacter* et *Nitrospira*, alpha-*Proteobacteria*) et de la flore hétérotrophe.

#### II-1.1.4. Utilisation conjointe de plusieurs techniques

Singh *et al.* ont utilisé trois techniques différentes pour caractériser une flore provenant des équipements d'un fauteuil de dentiste : la culture sur gélose, l'hybridation avec des sondes ARNr et l'amplification suivie du clonage et du séquençage de l'ADNr 16S (Singh *et al.* 2003). La technique de séquençage s'est révélée la plus efficace : elle a permis de mettre en évidence une grande diversité, avec des espèces appartenant essentiellement aux classes des alpha-, beta- et gamma- *Proteobacteria*. Les genres les plus fréquents étaient *Leptospira* (20%), *Sphingomonas* (14%), *Bacillus* (7%), *Escherichia* (6%), *Geobacter* (5%) et *Pseudomonas* (5%). Les légionelles représentaient 3% des clones. La technique FISH n'a pas permis de mettre en évidence les alpha-*Proteobacteria*, tandis que la culture sur gélose R2A a occulté les beta-*Proteobacteria*.

#### **II-1.2. Espèces pathogènes pour l'Homme détectées dans les réseaux d'eau potable, d'après (Leclerc *et al.*, 2002, Theron *et al.*, 2002 et Szewzyk *et al.*, 2000)**

Parmi les espèces connues depuis longtemps comme pouvant être à l'origine d'épidémies ou d'infections sporadiques transmises par l'eau potable, certaines sont

maîtrisées grâce aux traitements de potabilisation mis en œuvre dans les pays industrialisés et ne sont donc plus que rarement isolées au cours d'épidémies : c'est le cas pour les bactéries des genres *Salmonella*, *Vibrio* et *Shigella*. Entre 1991 et 2000 le nombre d'épidémies détectées liées à la consommation d'eau potable aux Etats-Unis a été de 3 pour *Salmonella*, 1 pour *Vibrio cholerae* et 5 pour *Shigella* (Moore *et al.* 1993; Kramer *et al.* 1996; Levy *et al.* 1998; Barwick *et al.* 2000; Lee *et al.* 2002). Dans le cas de ce dernier genre, il semblerait que l'espèce *Shigella dysenteriae*, responsable des épidémies de dysenterie, ne soit plus retrouvée dans les réseaux, tandis que l'espèce *Shigella sonnei* reste impliquée dans des épidémies sporadiques de gastro-entérites.

Les espèces dites "émergentes" n'ont été isolées que récemment en pathologie humaine. Leur émergence correspond à celle de nouvelles populations sensibles : immuno-déprimés, nombreuses personnes âgées grâce à l'augmentation de l'espérance de vie, ... Elle a aussi été favorisée par l'apparition de nouveaux lieux potentiels de prolifération et bien souvent les pathogènes responsables n'ont pu être détectés que récemment grâce à la mise au point de nouvelles techniques.

#### II-1.2.1. Gamma-Proteobacteria

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont capables de se développer dans des environnements oligotrophes et peuvent donc proliférer dans les réseaux de distribution. Elles sont impliquées dans 10 à 20% des infections nosocomiales à cause de leur résistance aux antibiotiques et aux traitements de désinfection, mais sont considérées comme peu pathogènes chez l'adulte sain. Une colonisation importante de l'eau par certaines espèces (*P. fluorescens*, *P. putida*) peut aboutir à des problèmes de goût et d'odeur, sans risque pour les consommateurs. L'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infections humaines est *P. aeruginosa*. Elle peut survivre très longtemps dans l'eau à température ambiante et a la capacité de former des biofilms. D'autres espèces proches du genre *Pseudomonas* : *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia pickettii*, et *Sphingomonas paucimobilis* peuvent être impliquées dans des infections transmises par l'eau potable.

Neuf épidémies dues à des *Escherichia coli* entérohémorragiques transmises par l'eau potable ont été observées aux Etats-Unis entre 1991 et 2000. Les souches isolées appartiennent au sérotype O157 et produisent la toxine vero. Les symptômes développés par une personne infectée vont de la diarrhée légère accompagnée de fièvre et vomissements à la diarrhée sanglante sévère accompagnée de crampes abdominales douloureuses. Dans 10 à 15% des cas un syndrome urémique hémolytique accompagné d'une défaillance rénale peut survenir, avec risque de décès. Les enfants en bas âge et les personnes âgées sont des sujets à risque. La dose infectieuse est très faible (10 à 100 bactéries), les bactéries sont capables de croître dans une gamme de températures de 8 à 48°C et peuvent s'adapter à des conditions de stress en développant un phénotype de résistance au chlore (Lisle *et al.* 1998).

Certaines souches de *Y. enterocolitica* (sérotypes O3, O5, O8, et O9) possèdent des facteurs de virulence et causent des gastro-entérites chez l'Homme. La bactérie est capable de se multiplier à des températures très faibles (4°C) et pourrait donc survivre très longtemps dans l'environnement. Seulement quelques épidémies liées à l'eau potable ont été rapportées.

Les espèces appartenant au genre *Aeromonas* sont ubiquitaires de l'environnement. Elles sont sensibles au chlore, mais des bactéries peuvent échapper au traitement et sont capables de persister et de se multiplier dans les réseaux de distribution (Kuhn *et al.* 1997). Certaines souches produisent des entérotoxines et pourraient donc être la cause de gastro-entérites transmises par l'eau potable.

#### II-1.2.2. Epsilon-Proteobacteria

*Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sont des causes reconnues de gastro-entérites aiguës. La dose infectieuse est faible : 500 bactéries peuvent causer la maladie, et leur présence n'est pas corrélée avec celle des indicateurs de contamination fécale (coliformes). Ils peuvent survivre quelques semaines dans une eau à basse température, cette survie est améliorée en présence de biofilm. L'eau potable a été mise en cause dans quelques épidémies (cinq aux Etats-Unis entre 1991 et 2000), mais la bactérie est sensible aux traitements de désinfection

habituels. Elle est capable d'entrer dans un état viable mais non cultivable en cas de stress.

L'infection à *Helicobacter pylori* semble très répandue et associée à des pathologies digestives : gastrite chronique active, ulcères de l'estomac et du duodénum et cancer gastrique. La transmission est sans doute oro-fécale. La bactérie peut exister sous deux formes : une forme végétative bacillaire et une forme viable non cultivable coccoïde. Elle semble relativement sensible aux traitements de chloration (Johnson *et al.* 1997) mais elle a déjà été retrouvée dans des biofilms issus de réseaux de distribution d'eau potable (Park *et al.* 2001).

### II-1.2.3. Actinobacteria

Le genre *Mycobacterium* comprend des espèces reconnues depuis longtemps comme pathogènes : *M. tuberculosis* et *M. leprae*, mais aussi des espèces atypiques pouvant infecter des patients immunodéprimés : *M. avium* et *M. intracellulare* notamment. Elles sont responsables de pneumopathies et d'infections cutanées, parfois d'infections généralisées. Elles sont résistantes à la plupart des traitements de désinfection : chlore, chloramines, dioxyde de chlore et ozone, et tolèrent des gammes de pH et de températures étendues (Taylor *et al.* 2000). Elles sont retrouvées fréquemment dans les réseaux de distribution, à l'intérieur desquels elles sont capables de se multiplier (Falkinham *et al.* 2001; Le Dantec *et al.* 2002).

## II-2. PROTOZOAIRES

### II-2.1. Interactions protozoaires - bactéries

La flore protozoaire des réseaux d'eau potable est importante et variée. Certains protozoaires tels que les *Cryptosporidii* et les *Giardia* sont des contaminants transitoires des réseaux : ils s'y propagent sous forme kystique dormante mais sont incapables de s'y multiplier. D'autres tels que les flagellés, les ciliés et les amibes sont actifs dans les réseaux : ils se nourrissent de la flore et ont donc un rôle dans la régulation de la composition de cette flore (Ronn *et al.* 2002). Dans la revue de Sibille, il est fait mention de plusieurs études rapportant des concentrations de

protozoaires variant de  $10^4$  à  $10^5$  cellules / L , et d'une étude sur biofilm avançant le nombre de  $10^3$  protozoaires /  $\text{cm}^2$  (Sibille 1998). L'introduction d'un protozoaire prédateur au sein d'une communauté bactérienne complexe induit une pression de sélection qui peut entraîner des changements dans la composition de cette flore (Simek *et al.* 1997; Hahn *et al.* 1998). La capacité du protozoaire à ingérer les bactéries est notamment fonction de la taille de celles-ci : au sein d'une communauté bactérienne complexe, seules les bactéries inférieures à certaines tailles pourront être utilisées par une espèce donnée de protozoaire. Cette prédation peut entraîner l'apparition de phénotypes de résistance pour certaines espèces : formes filamenteuses longues (Hahn *et al.* 1999b), microcolonies en suspension (Matz *et al.* 2002), ou bactéries très mobiles (Matz *et al.* 2003) avec retour possible mais pas obligatoire au phénotype d'origine si le protozoaire disparaît (Hahn *et al.* 1999a, 2001). La modulation de la composition de la flore bactérienne par les protozoaires est aussi due à l'établissement d'un taux de renouvellement important des nutriments, notamment de l'azote qui autrement serait immobilisé dans la biomasse bactérienne. Une étude menée par Zubkov *et al.* a montré que 70 à 85% des nutriments ingérés par des protozoaires se nourrissant d'un biofilm bactérien étaient régénérés et libérés à proximité immédiate du biofilm (Zubkov *et al.* 1999). Certaines espèces bactériennes sont capables d'utiliser ces nutriments pour augmenter leur vitesse de croissance afin de renouveler rapidement la biomasse consommée par les protozoaires : elles deviennent donc dominantes sous l'action de la prédation (Pernthaler *et al.* 1997). La prédation des bactéries par les protozoaires a lieu essentiellement à la surface des biofilms (Eisenmann *et al.* 1998; Zubkov *et al.* 1999; Barbeau *et al.* 2001).

## II-2.2. Protozoaires non pathogènes

Les protozoaires non pathogènes : flagellés, ciliés et thécamoebiens représentent sans doute une part importante de la flore protozoaire totale des réseaux. Dans une étude menée sur un modèle de laboratoire, la composition de la flore protozoaire était la suivante : 93% de flagellés, 1,8% de ciliés, 1,6% de thécamoebiens et 1,1% d'amibes nues dans l'eau, 52% de ciliés et 48% de thécamoebiens dans le biofilm (Sibille *et al.* 1998). Les études portant sur la

composition de cette flore et sur son importance dans l'écologie des réseaux sont pourtant très peu nombreuses. Les genres ou espèces identifiés dans ces études sont : *Monas*, *Bodo* spp., *Entosiphon sulcatum* et des dinoflagellés pour le groupe des flagellés, *Chilodonella*, *Colpidium campilum* et des scuticociliés pour le groupe des ciliés, *Centropyxis*, *Trinema lineare* et *Euglipha* pour le groupe des thécamoebiens (Sibille 1998).

### II-2.3. Protozoaires pathogènes

La plupart des protozoaires infectieux pour l'Homme sont classés dans le groupe des pathogènes émergents.

Les protozoaires pathogènes comprennent notamment les genres *Cryptosporidium* et *Giardia*. Ceux-ci ont été rendus responsables d'épidémies de gastro-entérites très importantes et posent aujourd'hui un problème majeur de santé publique. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans les eaux de surface et dans les eaux potables (LeChevallier *et al.* 1991a, b). En Grande Bretagne, plus de 50% des eaux de surface et 37% des eaux potables peuvent être contaminées par *Cryptosporidium*, tandis qu'aux Etats-Unis plus de 80 % des ressources en eau de surface et 26 % des eaux potables ont été rapportées comme étant contaminées par *Cryptosporidium* (Smith *et al.* 1998). L'étude de Stott *et al.* rapporte que les *Cryptosporidii* peuvent être concentrés par d'autres espèces de protozoaires (Stott *et al.* 2003). *Stylonychia mytilus*, *Paramecium caudatum*, une espèce de cilié non identifiée et *Acanthamoeba culbertsonii* sont capables d'internaliser 30 à 45 oocystes, quantité supérieure à la dose infectieuse estimée : 10 à 30 oocystes. Les *Cryptosporidii* peuvent ensuite être relargués. Bien que les effets de cette ingestion sur la viabilité des oocystes n'aient pas été évalués, les auteurs suggèrent que ce processus pourrait avoir un rôle dans le transport et la diffusion des *Cryptosporidii* dans l'environnement.

Les *Cyclosporidi* sont des parasites coccidies découverts récemment et dont le cycle est mal connu. Ils sont à l'origine d'épisodes diarrhéiques successifs entrecoupés de périodes de rémission, chez des patients immunodéprimés ou non. Les oocystes peuvent être retrouvés dans l'eau et des épidémies liées à la

consommation d'eau potable ont été rapportées. Ces oocystes semblent relativement résistants à l'action du chlore. Les *Microsporidii* sont des parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés et des invertébrés, ils n'ont que récemment été reconnus comme pathogènes humains et affectent essentiellement les patients immunodéprimés. Ce sont des protozoaires présentant une morphologie caractéristique (pas de mitochondries). Deux espèces : *Entercytozoon bieneusi* et *Entercytozoon intestinalis* sont souvent impliquées dans des cas de diarrhées chez des patients atteints du SIDA. Ces parasites sont difficiles à isoler et à identifier. Une espèce proche des *Microsporidii* a été isolée à partir d'une amibe libre : *Vannella cirrifera*, elle même isolée à partir d'un réseau d'eau chaude domestique (Hoffmann *et al.* 1998).

*Toxoplasma gondii* est un parasite dont le cycle comprend deux hôtes : les kystes sont présents chez un premier hôte (oiseaux, mammifères), c'est lorsque ce premier hôte est consommé par un prédateur que les oocystes peuvent se développer. Les oocystes sporulés sont très résistants aux stress environnementaux et aux désinfectants et peuvent être retrouvés dans l'eau potable (Isaac-Renton *et al.* 1998).

## II-3. AMIBES LIBRES

### II-3.1. Ecologie

#### II-3.1.1. Présence dans l'environnement

Les amibes libres sont des protozoaires ubiquitaires de l'environnement. Elles ont été isolées dans différents types d'eaux (eau douce, eau de mer, piscines, réseaux de distribution d'eau potable, eau minérale embouteillée, tours aéro-réfrigérantes, ...), mais aussi à partir de prélèvements de sols, d'égouts, de composte, de poussière et d'air (Szenasi *et al.* 1998). Elles vivent à des interfaces : interface eau-sol, eau-animal, eau-plante, eau-air, et ont besoin d'être attachées à une surface lors de la phase de croissance. Certains genres : *Naegleria*, *Vannella* sont mobiles en suspension.

### II-3.1.2. Nutrition

Les amibes peuvent se nourrir de bactéries, de champignons, de levures, d'algues et de protozoaires (Rodriguez-Zaragoza 1994). Quelques centaines à quelques milliers de bactéries sont nécessaires à la formation d'un nouveau trophozoïte. (Rodriguez-Zaragoza 1994). Certaines espèces bactériennes semblent mieux assimilées que d'autres, et certaines espèces amibiennes semblent capables d'une meilleure assimilation. Ainsi Weekers *et al.* ont rapporté que *E. coli* K-12 et *Klebsiella aerogenes* sont facilement assimilées, tandis que les espèces pigmentées *Chromatium vinosum* et *Serratia marcescens* ne permettent qu'une faible croissance des amibes (Weekers *et al.* 1993). Par ailleurs sur les 3 espèces amibiennes étudiées *A. polyphaga* présentait la capacité de biosynthèse la moins élevée, celle de *A. castellanii* était 10 fois plus élevée et celle de *H. vermiformis* encore 10 fois plus élevée. D'autres auteurs rapportent une meilleure croissance de *A. castellanii* et de *A. polyphaga* en présence de *S. maltophilia*, *F. breve*, et *P. paucimobilis* qu'en présence de *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* et *E. coli* (Bottone *et al.* 1992). Une meilleure adhésion de certaines espèces aux amibes, et donc une meilleure capacité de prédation pourraient être en cause.

### II-3.1.3. Enkystement et résistance aux stress

Différents stress physiques ou chimiques peuvent induire la formation de kystes amibiens : anaérobiose (Turner *et al.* 1997), déplétion en nutriments, froid, chaleur, dessiccation, osmolarité élevée, concentrations élevées en ions magnésium, inhibiteurs de la synthèse d'ADN (mitomycine C), chloramphenicol, di-nitrophenol, ... (Lloyd *et al.* 2001). Ces kystes possèdent une double paroi dont la composition varie suivant les espèces, les rendant plus ou moins résistantes à différents stress. La tolérance des trophozoïtes est elle aussi variable d'une espèce à l'autre (Rodriguez-Zaragoza 1994). Chez *Naegleria* les deux formes sont sensibles au chlore, les trophozoïtes sont sensibles à des températures inférieures à +4°C et à la congélation, la température optimale de croissance se situe entre 40 et 45°C et elles ont besoin de beaucoup de matière organique. La présence de cellulose dans la paroi des kystes d'*Acanthamoeba* est un fait unique qui pourrait expliquer leur très grande résistance vis-à-vis de nombreux stress (Winiecka-Krusnell *et al.* 2001). Ainsi les kystes d'*A. polyphaga* survivent à une exposition pendant 18 heures à une



concentration de 50 mg / L de chlore libre (Kilvington *et al.* 1990), tandis qu'une exposition à 4 mg / L pendant 30 min suffit à inactiver 99,9% des kystes de *H. vermiformis* (Kuchta *et al.* 1993). Certaines souches de *Hartmannella* peuvent croître à des températures supérieures à 50°C (Rohr *et al.* 1998). *A. polyphaga* résiste à la congélation, *A. castellanii* à l'anoxie et à des pH acides (Turner *et al.* 1997). Il a été rapporté par Srikanth *et al.* que des espèce appartenant au genre *Acanthamoeba* étaient capables d'utiliser comme nutriments des biocides employés dans les tours aéroréfrigérantes (Srikanth *et al.* 1993). Mazur *et al.* ont revivifié des kystes d'*Acanthamoeba* conservés 24 ans à +4°C et ont constaté que les trophozoïtes étaient restés infectieux vis-à-vis de cobayes (Mazur *et al.* 1995).

### **II-3.2. Présence dans le circuit de production / distribution d'eau**

Les études (peu nombreuses) publiées montrent que les amibes libres sont présentes à la source à laquelle est prélevée l'eau qui sera potabilisée, tout le long de la chaîne de traitement / distribution et au point d'utilisation.

#### **II-3.2.1. Présence à la source**

Une étude menée par Ettinger *et al.* sur des eaux de rivière a permis d'isoler les genres *Naegleria*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella* et *Acanthamoeba* (Ettinger *et al.* 2003). L'importance relative de chaque genre était variable suivant la période de l'année à laquelle était réalisé le prélèvement : *Naegleria* prévalente de fin Mai à fin Juillet, *Vannella*, *Vahlkampfia* et *Hartmannella* prévalentes de début Août à fin Octobre, et *Acanthamoeba* retrouvée à la même période que *Naegleria*. La salinité de l'eau au point de prélèvement et le fait qu'il s'agissait d'un prélèvement de sédiment ou d'eau circulante intervenaient aussi. Par ailleurs des pluies abondantes avant le prélèvement entraînaient des quantités d'amibes dénombrées plus importantes.

#### **II-3.2.2. Présence dans le circuit de potabilisation / distribution**

Hoffmann *et al.* ont examiné pendant 3 ans la prévalence des amibes libres aux différentes étapes de potabilisation de 6 usines de traitement (Hoffmann *et al.* 2001). Trois usines étaient alimentées par de l'eau souterraine enrichie d'eau de

rivière, trois par de l'eau provenant de réservoirs. Toutes les eaux non traitées contenaient une variété importante d'amibes, notamment des *Naegleria* et des *Acanthamoeba*. Les quantités les plus importantes ont été retrouvées dans les eaux de rivière (200 à 90 000 amibes / L), la plupart des *Naegleria* étaient non thermophiles tandis que la plupart des *Acanthamoeba* l'étaient. Après les étapes de floculation, sédimentation et filtration la concentration amibienne était réduite d'un facteur 10 à 100, essentiellement par rétention. Dans certains cas la filtration sur charbon actif entraînait une augmentation de la diversité amibienne, notamment une augmentation de la prévalence des amibes thermophiles. Dans d'autres cas une augmentation de la quantité d'amibes était observée après une filtration sur sable, mais une seconde filtration sur charbon actif permettait une réduction. En sortie d'usine, un tiers des eaux étaient contaminées par des amibes (< 100 / L) n'appartenant pas aux genres *Acanthamoeba* ou *Naegleria*. Quatre genres différents, dont *Hartmannella*, pouvaient être retrouvés dans un même prélèvement. Une étude complémentaire réalisée sur une eau non contaminée en sortie d'usine a permis de montrer que les amibes étaient présentes aux points d'usage, sans doute à cause d'un relargage à partir du réseau de distribution. Les auteurs ont par ailleurs montré une fluctuation saisonnière des *Naegleria* qui n'étaient présentes que pendant les périodes chaudes de l'année, tandis que *Acanthamoeba* était retrouvée toute l'année.

### II-3.2.3. Présence dans les réseaux intérieurs

Des prélèvements qualitatifs ont été réalisés sur six réseaux de distribution hospitaliers par Rohr *et al.* (Rohr *et al.* 1998). *H. vermiformis* (65% des isolats), *Echinamoebae* spp. (15%), *Saccamoebae* spp. (12%) et *Vahlkampfia* spp. (9%) ont été détectées dans la moitié des échantillons d'eau chaude, 59% de ces isolats étaient capables de croître à 44°C et quatre isolats de *Hartmannella* ainsi que deux de *Saccamoeba* étaient capables de croître à 53°C. Par ailleurs des prélèvements réalisés par écouvillonnage sur des surfaces humides (douches, lavabos, robinets) se sont révélés positifs pour la moitié. *Acanthamoeba* (22% des isolats), *Naegleria* (22%), *Vahlkampfia* (20%), *Hartmannella* (15%) et *Vannella* (7%) ont été identifiées, 17% seulement de ces isolats étaient capables de croître à 44°C.

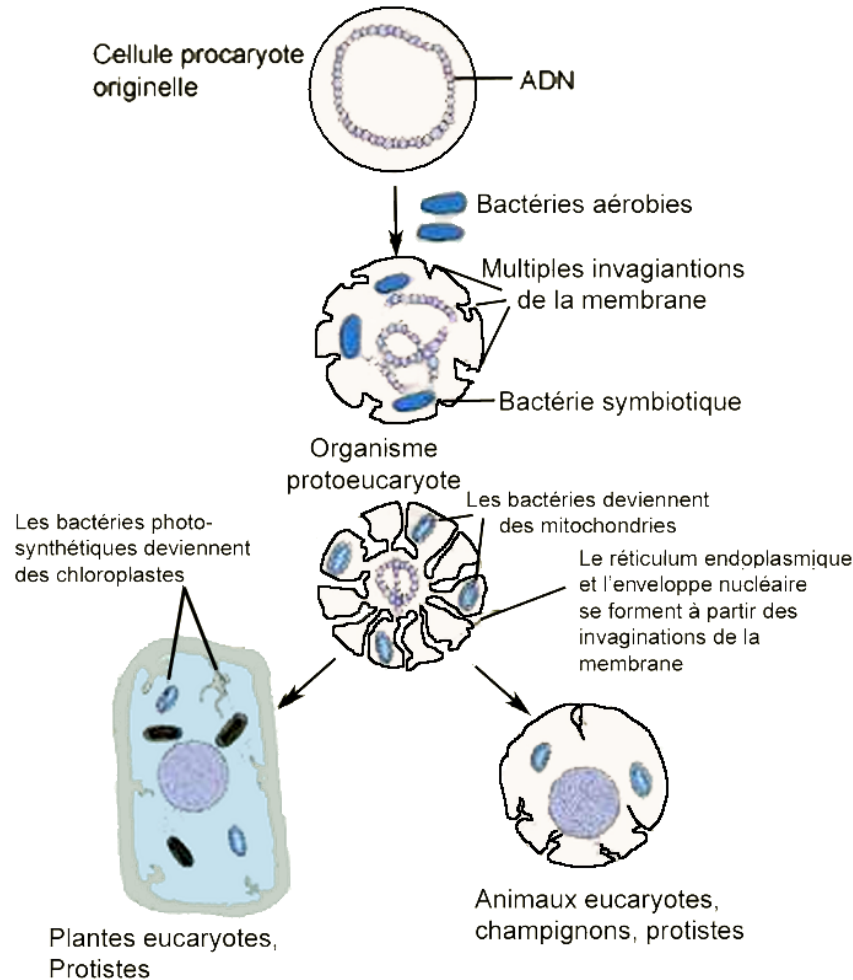
### II-3.3. Pathogénicité intrinsèque

Certaines espèces sont pathogènes pour l'Homme. Les encéphalites granulomateuses amibiennes sont causées par des amibes appartenant au genre *Acanthamoeba*, les méningo-encéphalites amibiennes primaires par *Naegleria fowleri* (Marciano-Cabral *et al.* 2003). Les premières affectent essentiellement des patients présentant des facteurs de risque (immunodépression, diabète, cancer, transplantation d'organe, ...), tandis que les secondes ont été rapportées chez des enfants ou des adultes sains (Cabanès *et al.* 2001). La porte d'entrée de l'infection peut être respiratoire par inhalation d'amibes et passage dans les poumons, ou cutanée par passage au niveau de lésions de la peau. L'accès au système nerveux central se fait via le sang à partir du site primaire de l'infection, ou directement à travers l'épithélium olfactif. Le délai d'apparition des symptômes peut être long dans le cas de l'encéphalite granulomateuse : quelques semaines à quelques mois, tandis qu'il est généralement court dans le cas de la méningo-encéphalite primaire : 5 à 10 jours. Dans les deux cas l'issue est généralement fatale. Les *Acanthamoeba* sont aussi responsables de lésions cutanées chez les patients immuno-déprimés, et de kératites chez les porteurs de lentilles de contact. Certains auteurs suggèrent que des espèces appartenant aux genres *Hartmannella* et *Vahlkampfia* pourraient aussi être impliquées dans les kératites (Kinneer 2003).

### II-3.4. Endosymbiontes (Tab. VI)

L'un des premiers cas de symbiose obligatoire entre une amibe libre et une bactérie a été rapporté par l'équipe de Jeon *et al.* En 1968, les auteurs ont constaté l'infection spontanée d'une culture d'*Acanthamoeba proteus* par une bactérie non identifiée ("bactérie X"). Cette bactérie était virulente, se multipliant dans les amibes et entraînant la lyse de la plupart des cellules infectées. Cependant après quelques années le nombre moyen de bactéries par amibe est passé de 100 000 à 42 000, l'amibe se développant normalement et devenant même dépendante de la bactérie pour sa survie. Les auteurs ont démontré par la suite que l'amibe ne produisait plus une protéine cytoplasmique essentielle, mais que l'activité enzymatique était assurée par une protéine produite par la bactérie X (Jeon 1995; Choi *et al.* 1997). Cette observation renforce la théorie d'une origine endosymbiotique des cellules

eucaryotes : les mitochondries seraient des bactéries ayant établi une symbiose obligatoire avec une autre cellule, donnant naissance aux cellules eucaryotes (Fig. 7).



**Figure 7 : Schéma de principe de la théorie de l'origine endosymbiotique de la vie**

L'étude des endosymbiontes a pris un essor important avec l'avènement des méthodes de biologie moléculaire : le séquençage de l'ADN 16S et la mise au point de sondes spécifiques a permis d'identifier et de détecter plusieurs nouvelles espèces. Ainsi en 1991 Amann *et al.* ont identifié des alpha-*Proteobacteria* endosymbiontes de *Paramecium caudatum* : *Holospora elegans* et *Holospora undulata* infectent les *micronucleii* tandis que *Holospora obtusa* infecte le *macronucleus* (Amann *et al.* 1991).

Une étude menée par Fritsche *et al.* en 1993 a montré qu'environ 25% des isolats cliniques et environnementaux d'*Acanthamoeba* contenaient des endosymbiontes bactériens d'aspects variés mais possédant tous une paroi typique des Gram – (Fritsche *et al.* 1993).

Deux bacilles endosymbiontes d'*Acanthamoeba* constitueraient un nouveau genre au sein de la famille des *Rickettsiales*, qui elle-même appartient à la sous-classe des alpha-*Proteobacteria* et comprend de nombreuses espèces pathogènes ainsi que des symbiontes d'insectes (Fritsche *et al.* 1999).

#### II-3.4.1. Endosymbiontes potentiellement pathogènes pour l'Homme

Nous regroupons dans cette catégorie des endosymbiontes qui n'ont jamais été isolés directement en clinique mais que l'on suspecte fortement d'être responsables d'infections humaines. Dans certains cas cette suspicion tient seulement à la capacité de ces bactéries à infecter les protozoaires. En effet ces protozoaires miment la capacité qu'ont les phagocytes humains à ingérer et à détruire de nombreuses bactéries, l'adaptation des bactéries aux protozoaires serait donc un préalable à l'adaptation aux cellules humaines. Dans d'autres cas des signes indirects ont été mis en évidence : détection de l'ADN des bactéries dans des prélèvements cliniques, séroconversion des patients.

##### II-3.4.1.a. Alpha-*Proteobacteria*

Dans cette classe figure *Afipia felis*, capable de se multiplier dans *A. polyphaga* et qui a été isolée dans un réseau hospitalier d'eau potable en même temps que d'autres espèces proches qui seraient potentiellement pathogènes pour l'Homme (La Scola *et al.* 2000). Les espèces nouvellement décrites : *Bosea eneeae*, *Bosea massiliensis* et *Bosea vestrisii* ont été isolées dans les mêmes conditions (La Scola *et al.* 2003a) et une séroconversion à *B. massiliensis* a été observée chez des patients hospitalisés en soins intensifs (La Scola *et al.* 2003b).

Tableau VI : Micro-organismes capables de survivre et / ou de se multiplier à l'intérieur d'amibes libres

Micro-organisme	Type d'infection	Hôtes	Multiplication intra-ambienne	Survie dans les kystes	Référence
	chez l'Homme	protozoaires			
<i>Afipia</i> spp.	Respiratoire	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	oui	?	(La Scola <i>et al.</i> 2000)
<i>Bosea</i> spp.	Respiratoire	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	oui	?	(La Scola <i>et al.</i> 2003a)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Respiratoire	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	oui	?	(Landers <i>et al.</i> 2000)
<i>Burkholderia gladioli</i>	Respiratoire, toxi-infections alimentaires	<i>A. polyphaga</i> , <i>A. castellanii</i>	oui	?	(Marolda <i>et al.</i> 1999)
<i>Burkholderia multivorans</i>	Respiratoire	<i>A. polyphaga</i> , <i>A. castellanii</i>	oui	?	(Marolda <i>et al.</i> 1999)
<i>Burkholderia pickettii</i>	Respiratoire, septicémie	<i>Acanthamoeba</i> spp.	oui	?	(Michel <i>et al.</i> 1997)
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Multiples sites possibles	<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	non	oui	(Ingliš <i>et al.</i> 2000)
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	?	<i>A. polyphaga</i> , <i>A. castellanii</i>	oui	?	(Marolda <i>et al.</i> 1999)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastro-entérite	<i>A. castellanii</i> , <i>T. pyriformis</i>	non	?	(King <i>et al.</i> 1988)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Respiratoire	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	+ / -	?	(Essig <i>et al.</i> 1997)
<i>Coxiella burnetii</i>	Fièvre Q	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	non	?	(La Scola <i>et al.</i> 2001)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Méningite	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	oui	?	(Steenbergen <i>et al.</i> 2001)
<i>Cryptosporidium</i> (oocystes)	Gastro-entérite	<i>Stylonychia mytilus</i> , <i>Paramecium caudatum</i> , <i>A. culbertsonii</i>	concentration	?	(Stott <i>et al.</i> 2003)
Micro-organismes <i>Ehrlichia</i> -like	Granulocytose	<i>Saccamoeba</i> spp.	oui	?	(Michel <i>et al.</i> 1995b)
<i>Escherichia coli</i> O157	Syndrome urémique hémolytique	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	oui	?	(Barker <i>et al.</i> 1999)
<i>Francisella tularensis</i>	Multiples sites possibles	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	oui	oui	(Abd <i>et al.</i> 2003)
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastriques	<i>A. astronyxis</i> , <i>A. castellanii</i>	oui	?	(Marciano-Cabral <i>et al.</i> 2003)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listériose foeto-maternelle, septicémie, SNC	<i>Acanthamoeba</i> , <i>T. pyriformis</i>	+ / -	non	(Ly <i>et al.</i> 1990)
<i>Microsporidii</i>	Gastro-entérite, cholangiopathie	<i>Vannella</i> spp.	oui	?	(Hoffmann <i>et al.</i> 1998)
<i>Mobiluncus curtisii</i>	Infections vaginales, abcès	<i>A. culbertsonii</i> , <i>Acanthamoeba</i> spp.	oui	?	(Tomov <i>et al.</i> 1999)
<i>Mycobacterium avium</i>	Respiratoire	<i>A. polyphaga</i> , <i>A. castellanii</i>	oui	oui	(Steinert <i>et al.</i> 1998)
<i>Mycobacterium bovis</i>	Tuberculose (bétail)	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	oui	oui	(Taylor <i>et al.</i> 2003)
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lèpre	<i>Acanthamoeba</i> spp.	non	?	(Jadin 1975)
<i>Neochlamydia hartmannellae</i>	Respiratoire ?	<i>H. vermiformis</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i>	oui	non	(Horn <i>et al.</i> 2000)
Pathogènes amibiens <i>Legionella</i> -like 1 à 12	Respiratoire	<i>Acanthamoeba</i> spp., <i>Hartmanella</i> spp.	oui	?	(Rowbotham 1993)
<i>Parachlamydia acanthamoeba</i>	Respiratoire ?	<i>Acanthamoeba mauritaniensis</i> , <i>A. castellanii</i>	oui	non	(Amann <i>et al.</i> 1997)

Tableau VI : suite

Micro-organisme	Type d'infection chez l'Homme	Hôtes protozoaires	Multiplication intra-amibienne	Survie dans les kystes	Référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Multiples sites possibles	<i>A. polyphaga</i> , <i>Echinamoeba</i>	oui	oui	(Michel <i>et al.</i> 1995a)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gastriques	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	oui	?	(Gaze <i>et al.</i> 2003)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gastriques	<i>A. castellanii</i> , <i>T. pyriformis</i>	non	?	(King <i>et al.</i> 1988)
<i>Shigella sonnei</i>	Gastriques	<i>A. castellanii</i> , <i>T. pyriformis</i>	non	?	(King <i>et al.</i> 1988)
<i>Simkania negevensis</i>	Respiratoire ?	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	oui	oui	(Kahane <i>et al.</i> 2001)
<i>Vibrio cholerae</i>	Gastriques	<i>Naegleria gruberi</i>	oui	oui	(Thom <i>et al.</i> 1992)
<i>Vibrio cholerae</i>	Gastriques	<i>A. polyphaga</i>	oui	non	(Thom <i>et al.</i> 1992)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastriques	<i>A. castellanii</i> , <i>T. pyriformis</i>	non	?	(King <i>et al.</i> 1988)
Bactérie X	?	<i>Acanthamoeba proteus</i>	oui	oui	(Choi <i>et al.</i> 1997)
<i>Candidatus Amoebophilus asiaticus</i>	?	<i>Acanthamoeba</i> spp.	oui	oui	(Horn <i>et al.</i> 2001)
<i>Candidatus Caedibacter acanthamoebae</i>	?	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	oui	oui	(Horn <i>et al.</i> 1999)
<i>Candidatus Paracaedibacter acanthamoebae</i>	?	<i>Acanthamoeba</i> spp.	oui	oui	(Horn <i>et al.</i> 1999)
<i>Candidatus Paracaedibacter symbiosus</i>	?	<i>Acanthamoeba</i> spp.	oui	oui	(Horn <i>et al.</i> 1999)
<i>Candidatus Procabacter acanthamoeba</i>	?	<i>Acanthamoeba</i> spp.	oui	oui	(Horn <i>et al.</i> 2002)
UWC36 endosymbionte <i>Rickettsia</i> -like	?	<i>Acanthamoeba</i> spp.	oui	?	(Fritsche <i>et al.</i> 1999)
UWC8 endosymbionte <i>Rickettsia</i> -like	?	<i>Acanthamoeba</i> spp.	oui	?	(Fritsche <i>et al.</i> 1999)
Mimivirus	?	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	oui	?	(La Scola <i>et al.</i> 2003c)

Plusieurs endosymbiontes d'*Acanthamoeba* ont été identifiés comme étant proches du symbionte de la paramécie : *Caedibacter caryophilus*, il a donc été proposé de les regrouper dans un nouveau genre : *Paracaedibacter* (Horn *et al.* 1999). Deux des espèces appartenant à ce nouveau genre infectent des *Acanthamoeba* spp. phylogénétiquement éloignées des 12 types déjà existants. Les auteurs suggèrent que hôtes et symbiontes ont co-évolué.

#### *II-3.4.1.b. Beta-Proteobacteria*

D'autres bacilles Gram – pour lesquels un nouveau genre : *Procabacter* a été proposé, appartiennent à la sous-classe beta des protéobactéries (Horn *et al.* 2002). Cinq des six espèces de *Procabacter* identifiées infectent des *Acanthamoebae* de type 4. Parmi les 12 types définis par séquençage de l'ADN 18S, le type 4 est le plus fréquemment rencontré en clinique et dans l'environnement.

#### *II-3.4.1.c. Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*

Le nom *Aemoebophilus asiaticus* a été proposé pour un endosymbionte appartenant à ce phylum. Au cours de l'étude qui a permis d'identifier cette nouvelle espèce, deux endosymbiontes non obligatoires d'*Acanthamoeba* spp. ont été identifiés; ils appartiennent au genre *Flavobacterium* et seraient potentiellement pathogènes pour l'Homme (Horn *et al.* 2001).

#### *II-3.4.1.d. Chlamydiales*

Trois familles sont venues compléter récemment le phylum des *Chlamydiales* dont on pensait jusqu'ici qu'il ne comptait que peu de représentants (Amann *et al.* 1997; Horn *et al.* 2000) : les *Parachlamydiaceae*, les *Simkaniaceae* et les *Waddliaceae* (Fig. 8). L'espèce *Simkania negevensis* a été impliquée récemment dans des infections respiratoires humaines (Lieberman *et al.* 2002). Elle est capable d'infecter *A. polyphaga*, de s'y multiplier et de survivre dans les kystes. Le pourcentage d'individus sains présentant une séroconversion est très important : 55 à 80%, signe de la fréquence élevée de cette infection (Friedman *et al.* 2003).



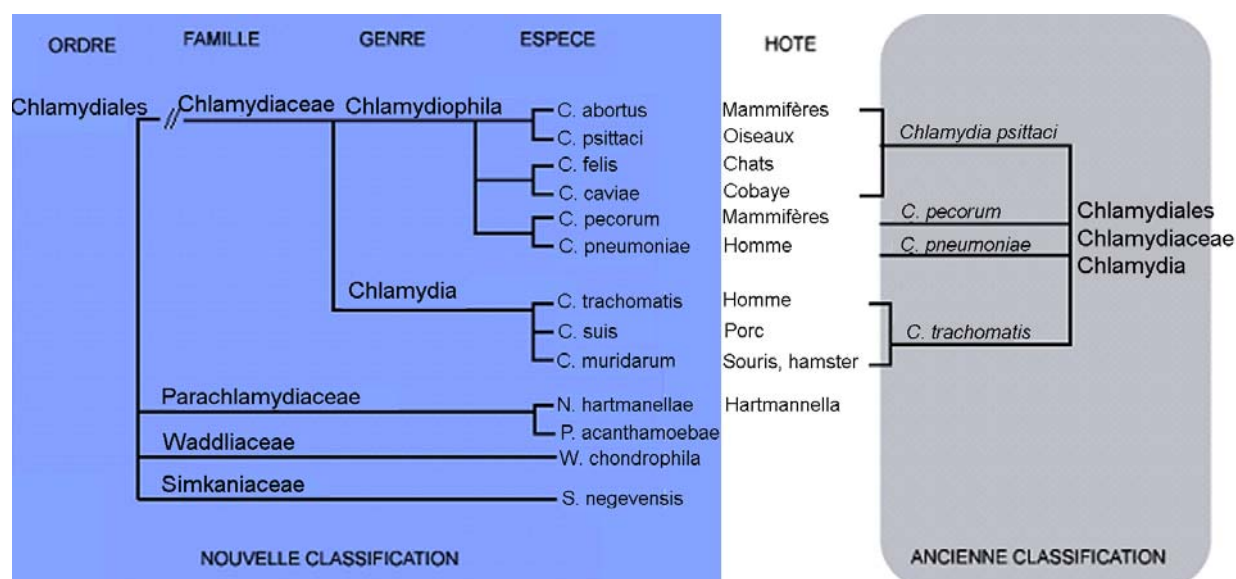


Figure 8 : Ancienne et nouvelle classification des *Chlamydiales* ([www.chlamydiae.com](http://www.chlamydiae.com))

Des endosymbiontes coccoïdes d'*Acanthamoeba* représentant au moins deux nouveaux genres : *Parachlamydia acanthamoeba*, infectant *Acanthamoeba* spp., et *Neochlamydia hartmannellae*, infectant *H. vermiformis*, constituent la famille des *Parachlamydiaceae*. Contrairement aux symbiontes cités ci-dessus qui sont capables de survivre dans les kystes de leurs hôtes, les bactéries appartenant à ces deux nouveaux genres semblent diminuer (*Parachlamydia* (Greub *et al.* 2002)) voire bloquer (*Neochlamydia* (Horn *et al.* 2000)) le processus d'enkystement. Dans le cas des *Neochlamydiae* un traitement drastique d'axénisation à la rifampicine permet de cultiver des amibes exemptes de bactéries intracellulaires et qui ont recouvré leur capacité à s'enkyster, ces symbiontes ne sont donc pas nécessaires à la survie des amibes. Comme dans le cas de l'infection par les légionelles, les *Acanthamoeba* spp. infectées par les *Parachlamydia* spp. peuvent excréter de petites vésicules remplies de bactéries. Par ailleurs Fritsche *et al.* ont démontré que les *Acanthamoeba* spp. infectées par des endosymbiontes du genre *Parachlamydia* ont une virulence plus importante vis-à-vis de cultures de fibroblastes (Fritsche *et al.* 1998). Ces bactéries pourraient être à l'origine de pneumopathies chez l'Homme car des séquences d'ADNr 16S ont été isolées chez des patients souffrant de bronchites (Birtles *et al.* 1997; Ossewaarde *et al.* 1999), et une étude récente a démontré que des patients hospitalisés en réanimation peuvent présenter une séroconversion vis-à-vis de ces bactéries (Greub *et al.* 2003b). Elles sont retrouvées chez des hôtes amibiens

proches phylogénétiquement mais très éloignés géographiquement, suggérant une distribution importante (Fritsche *et al.* 2000). Dans toutes les études rapportées ci-dessus, l'utilisation simultanée de sondes fluorescentes spécifiques des endosymbiontes identifiés et de sondes de spécificité plus large n'a jamais permis de mettre en évidence plusieurs endosymbiontes différents dans une même amibe. La température semble jouer un rôle important dans l'activation de la virulence des *Parachlamydiaceae* vis-à-vis de leur hôte : en-dessous de 30°C elles se comportent en symbionte d'*A. polyphaga*, au-dessus elles entraînent la lyse cellulaire (Greub *et al.* 2003a). Par ailleurs la spécificité hôte-symbionte peut être telle que l'infection forcée d'une autre espèce d'amibe par un symbionte résulte dans la lyse de l'amibe. Un phage infectant *N. hartmanellae* a été mis en évidence par Schmid *et al.*, il pourrait intervenir dans la régulation de la population bactérienne intra-amibienne (Schmid *et al.* 2001).

#### II-3.4.2. Endosymbiontes pathogènes avérés pour l'Homme

Outre les associations décrites ci-dessus entre des amibes et des espèces bactériennes potentiellement pathogènes pour l'Homme, un grand nombre d'associations impliquant cette fois des espèces pathogènes avérées isolées en clinique ont été décrites. La grande majorité de ces associations impliquent des amibes libres appartenant au genre *Acanthamoeba*. De même que dans le cas des endosymbiontes, plusieurs types d'associations existent.

##### *II-3.4.2.a. Pathogènes capables de survivre dans les trophozoïtes sans s'y multiplier*

Ce cas de figure a été décrit pour *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei* et *Campylobacter jejuni* (King *et al.* 1988). Les auteurs ont démontré que ces entéropathogènes sont capables de survivre à l'intérieur de *A. castellanii* et de *T. pyriformis*, et qu'ils sont ainsi protégés de l'action du chlore (King *et al.* 1988). Dans le cas de *S. typhimurium*, une publication récente rapporte cependant la capacité de la bactérie à se multiplier dans les vacuoles pulsatiles d'amibes de l'espèce *A. polyphaga* (Gaze *et al.* 2003).

*Burkholderia pseudomallei* est responsable de la maladie mélioïdose, une infection potentiellement fatale présentant plusieurs formes : septicémique, subaiguë, et chronique. L'infection se fait principalement par inhalation d'air contaminé. La forme septicémique aiguë peut se présenter après plusieurs décennies sans épisodes infectieux, les bactéries survivant dans les macrophages durant cette période. Inglis *et al.* ont démontré récemment que cette bactérie était capable d'infecter *Acanthamoeba astronyxis* et de survivre (sans multiplication) dans l'amibe mais aussi dans le kyste (Inglis *et al.* 2000). Un mécanisme de phagocytose par enroulement semblable à celui décrit pour *L. pneumophila* a été mis en évidence, le flagelle de la bactérie semble nécessaire à l'adhésion et à l'entrée dans l'amibe (Inglis *et al.* 2003).

*Coxiella burnetii* est l'agent de la fièvre Q, une zoonose très répandue. C'est un micro-organisme strictement intra-cellulaire qui se multiplie à l'intérieur des vacuoles phago-lysosomales des monocytes et des macrophages. La transmission à l'Homme est fréquente, notamment par l'intermédiaire des placentas d'animaux d'élevage infectés qui peuvent contenir jusqu'à  $10^9$  bactéries par gramme. Le pouvoir infectieux de la bactérie est très élevé puisque qu'une seule bactérie peut suffire à contaminer l'Homme ou l'animal. Cette espèce est très proche phylogénétiquement des légionelles, elle possède aussi un système de sécrétion de type IVB et est capable de survivre à l'intérieur des trophozoïtes de *A. castellanii* (La Scola *et al.* 2001).

Il a été rapporté que *Mycobacterium leprae*, l'agent de la lèpre, est capable de survivre dans des trophozoïtes d'*Acanthamoeba* (Jadin 1975; Grange *et al.* 1987). Cependant les mécanismes de cette interaction n'ont pas été étudiés.

#### *II-3.4.2.b. Pathogènes capables de survivre et de se multiplier dans les trophozoïtes*

*Chlamydia pneumoniae* est capable d'infecter *A. castellanii*, la multiplication intra-cellulaire semble toutefois limitée (Essig *et al.* 1997). De manière comparable à celui de *L. pneumophila*, le LPS présente des acides gras à longues chaînes poly-substitués qui pourraient conférer aux bactéries une résistance vis-à-vis de la digestion par les estérases et les amidases amibiennes. Par ailleurs ce LPS est peu

endotoxique, signe d'une adaptation à la vie intra-cellulaire. Enfin, *Chlamydia trachomatis* possède une protéine de type Mip semblable à celle de *L. pneumophila* (Lundemose *et al.* 1991).

*Listeria monocytogenes* survit à l'ingestion par *Acanthamoeba* spp. ou *Tetrahymena pyriformis* (Ly *et al.* 1990). Au bout de 8 jours les protozoaires sont lysés et des *Listeria* viables sont libérées. La multiplication intra-cellulaire semble cependant limitée et les bactéries ne survivent pas dans les kystes.

L'espèce *Helicobacter pylori* est responsable d'ulcères gastriques et duodénaux. Par ailleurs l'infection par ce micro-organisme constituerait un facteur de risque dans le développement de cancers touchant l'appareil digestif (Leclerc *et al.* 2002). Il a été démontré que *H. pylori* est capable de survivre et de se multiplier dans *A. castellanii* (Winiecka-Krusnell *et al.* 2002) et dans *A. astronyxis* (Marciano-Cabral *et al.* 2003). L'espace intra-amibien convient donc à cette bactérie qui requiert pourtant des conditions particulières de croissance : micro-aérobie et grandes quantités de nutriments.

*Mobiluncus curtisii* est une espèce bactérienne anaérobie responsable d'infections vaginales. Il a été démontré par Tomov *et al.* que des *Acanthamoeba* spp. pouvaient servir de niches de réplication de cette bactérie en milieu aérobie (Tomov *et al.* 1999). Cette multiplication est très efficace puisque le nombre de bactéries augmente de deux à quatre log en une ou deux semaines.

Des espèces appartenant au genre *Burkholderia* : *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. multivorans*, *B. pickettii* et *B. vietnamiensis*, essentiellement responsables d'infections respiratoires, sont capables de survivre mais aussi de se multiplier dans les trophozoïtes d'*A. castellanii* et / ou *A. polyphaga* (Michel *et al.* 1997; Marolda *et al.* 1999; Landers *et al.* 2000). En revanche leur capacité à survivre dans les kystes n'a pas été déterminée.

D'autres espèces bactériennes pathogènes largement décrites sont capables de se multiplier dans des protozoaires : *Escherichia coli* O157 (Barker *et al.* 1999), *Mycobacterium avium* (Steinert *et al.* 1998; Miltner *et al.* 2000), *Mycobacterium bovis* (Taylor *et al.* 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (Michel *et al.* 1995a; Marciano-Cabral

*et al.* 2003) et *Vibrio cholerae* (Thom *et al.* 1992) infectent *A. castellanii* et / ou *A. polyphaga*. Bien que cela ne soit pas encore complètement avéré concernant *E. coli*, ces espèces sont capables de survivre dans les kystes des amibes qu'elles infectent. Dans le cas de *V. cholerae*, la bactérie est capable d'infecter et de se multiplier dans *Naegleria gruberi* et *A. polyphaga*, mais elle ne peut survivre que dans les kystes de *N. gruberi*.

*Francisella tularensis* est responsable de la tularémie, elle est isolée du milieu extérieur et de très nombreuses espèces animales domestiques ou sauvages. *F. tularensis* subsp. *tularensis* est très pathogène pour l'homme : l'inhalation ou l'introduction par voie intradermique de 10 à 50 bactéries suffisent à provoquer une infection clinique et le taux de mortalité atteint 6% en l'absence de traitement. Cette bactérie est capable de se multiplier dans les trophozoïtes et de survivre dans les kystes d'*A. castellanii* (Abd *et al.* 2003). Par ailleurs, une fois phagocytée par les macrophages, elle semble capable d'échapper aux phagosomes grâce à un mécanisme permettant la dégradation de la membrane phagosomale (Golovliov *et al.* 2003).

Les infections de l'homme à *Ehrlichia chaffeensis* sont souvent graves et conduisent à une hospitalisation du malade dans 40 à 80% des cas. La bactérie se multiplie dans les monocytes et les macrophages de l'hôte infecté, elle aurait un cycle de développement proche de celui des *Chlamydiae*. L'infection se traduit le plus souvent par de la fièvre, de l'anorexie, des céphalées, des myalgies, des arthralgies, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales. La transmission se fait par des tiques contaminées. Des espèces apparentées au genre *Ehrlichia* ont été décrites par Michel *et al.*, il s'agit de parasites intra-cellulaires obligatoires de protozoaires du genre *Saccamoeba* (Michel *et al.* 1995b).

*Cryptococcus neoformans* est un champignon tellurique responsable de méningites graves chez des patients immunodéprimés. C'est un pathogène intra-cellulaire facultatif capable de se multiplier dans les macrophages. L'étude de Steenbergen *et al.* a récemment prouvé que ce micro-organisme est capable de se multiplier dans les trophozoïtes d'*A. castellanii* (Steenbergen *et al.* 2001). La virulence vis-à-vis des cellules mammifères serait donc due à la pression de

sélection imposée par les micro-organismes prédateurs de l'environnement, et expliquerait le large spectre d'hôtes de ce pathogène.

#### II-3.4.3. Virus

Outre ces symbiotes bactériens des amibes, il a récemment été décrit un virus géant retrouvé dans le cytoplasme d'une souche d'*A. polyphaga*. La taille (400 nm de diamètre) et la longueur du génome (800 kbp) sont comparables à ceux de certaines bactéries, une nouvelle famille a été créée pour ce virus : les Mimivirus, on ne sait pas quel est l'impact du virus sur son hôte (La Scola *et al.* 2003c).

### **III- BIOFILM**

Le biofilm est constitué d'une communauté de micro-organismes fixés à une surface et généralement inclus dans une matrice extra-cellulaire (Carpentier *et al.* 1993). Plus généralement, est considérée comme biofilm toute association de micro-organismes adhérant entre eux ou à une surface (Costerton *et al.* 1995). Cette définition regroupe des situations très différentes, depuis quelques bactéries adhérentes à une surface, à des biofilms épais présentant une diversité écologique importante, en passant par la flore commensale de la peau. On admet généralement que dans un écosystème donné le nombre de bactéries attachées aux surfaces est 1 000 à 10 000 fois plus important que le nombre de bactéries planctoniques (Watkins & Costerton 84).

Les avantages conférés par cette structure communautaire sont nombreux (Davey *et al.* 2000) :

- protection vis-à-vis des conditions environnementales grâce à la matrice d'exopolymères qui structure le biofilm, assurant une homéostasie du milieu,
- nutrition et coopération métabolique : des canaux aqueux sont présents dans toute la structure du biofilm, ils permettent l'échange de nutriments et de métabolites entre les espèces du biofilm et avec l'extérieur,
- échange de matériel génétique : la proximité des cellules favorise ces échanges, tendant vers une stabilisation de la structure du biofilm.

#### **III-1. FORMATION DU BIOFILM**

##### **III-1.1. Adhésion**

Dans le cas particulier de l'eau potable constituant un milieu pauvre en nutriments, les premières espèces colonisatrices seraient d'abord des bactéries possédant des mécanismes extrêmement efficaces d'acquisition des nutriments, capables de se multiplier dans des milieux très pauvres tels que de l'eau distillée (Szewzyk *et al.* 2000). Ainsi les bactéries appartenant aux genres *Pedomicrobium*,

*Hyphomicrobium*, *Caulobacter* (alpha-Proteobacteria), *Gallionella* et *Burkholderia* (beta-Proteobacteria) sont souvent retrouvées.

### III-1.1.1. Mécanismes

#### III-1.1.1.a. Conditionnement des surfaces

Un phénomène important survenant avant l'adhésion des bactéries est le conditionnement des surfaces. En effet l'immersion d'un support vierge de toute contamination dans un liquide est immédiatement suivie par une adsorption de sels, de protéines, de glycoprotéines, ... Cette adsorption peut être en partie conditionnée par les propriétés physico-chimiques de la surface et des molécules. La formation rapide d'un film contenant des matières organiques entraîne une modification des propriétés de surface, et éventuellement une modification de l'affinité des bactéries pour cette surface (Carpentier *et al.* 1993). Ces dépôts organiques n'étant pas répartis de manière homogène sur la surface immergée, la colonisation bactérienne sera plus ou moins influencée.

#### III-1.1.1.b. Forces d'adhésion

Les bactéries peuvent entrer en contact avec le support grâce à différents moyens : transport passif *via* le fluide circulant, diffusion passive résultant des mouvements Browniens, ou mouvements actifs grâce à des structures telles que les flagelles. Les premières étapes de l'interaction des cellules avec la surface constituent l'adhésion réversible. Elle est la résultante de différents types de forces opérant entre la surface inerte et la surface de la bactérie elle-même : (1) les forces d'attraction de Van der Waals, (2) les forces électrostatiques (souvent répulsives car la plupart des bactéries et des surfaces inertes sont chargées négativement), (3) les interactions hydrophobes pouvant conduire à une attraction ou à une répulsion, (4) les interactions stériques toujours répulsives. Durant cette phase, les bactéries montrent toujours des mouvements Browniens et sont facilement détachables.

Deux théories ont été proposées pour décrire ce phénomène d'adsorption :



- La théorie de Derjaquin, Landau, Verwey, et Overbeek (DLVO) ne prend en compte que les forces électrostatiques, répulsives, et les forces de Van der Waals, attractives (Marshall *et al.* 1971). La résultante de ces interactions conduit à l'attraction ou à la répulsion. Lorsqu'il s'approche à 10 nm de la paroi, le micro-organisme adhère de manière réversible. A 5 nm, la résultante des forces devient positive, ce qui correspond à une barrière de répulsion. Les filaments d'exopolymères synthétisés par la bactérie franchissent cette zone, ce qui permet au micro-organisme d'atteindre le minimum secondaire à 2 nm, et d'adhérer irréversiblement.
- La théorie du mouillage, basée sur la thermodynamique des surfaces, néglige les forces électrostatiques : il y aurait adhésion des micro-organismes aux surfaces si la variation d'énergie libre du système est négative. L'hydrophobicité de la bactérie et du support jouent un rôle important dans la description de l'adhésion, elle fait intervenir les interactions acido-basiques de Lewis. Différentes équations ont été proposées pour calculer les énergies libres de surface grâce à des mesures d'angles de contact entre liquides et surfaces à la fois pour les micro-organismes et le support inerte (Bellon-Fontaine *et al.* 1990).

### III-1.2. Facteurs modifiant l'adhésion

#### III-1.2.1. Composition des parois des micro-organismes

##### III-1.2.1.a. Hydrophobicité et charges de surfaces

L'hydrophobicité des bactéries varie en fonction des espèces considérées, elle est attribuée à différents composés (Fig. 9) :

- protéines présentant des régions hydrophobes : ainsi, l'hydrophobicité de surface de *Streptococcus pyogenes* est due à la présence de protéines de surface ou de glycolipides complexés et orientés par ces protéines de surface (Ofek *et al.* 1983)

- l'acide lipotéichoïque (LTA) est impliqué dans les interactions hydrophobes de bactéries à Gram + : le LTA libéré dans la paroi, à partir de son site initial à la surface de la membrane cytoplasmique, peut adopter une conformation dans laquelle les interactions ioniques entre sa chaîne polyglycérophosphate et des composants de la paroi orientent la portion lipidique du LTA vers la surface externe, conférant des propriétés hydrophobes à la bactérie (Ofek *et al.* 1982)
- présence de quantités importantes de lipides à la surface des cellules d'*Actinomycetaceae*, rendant cette surface hydrophobe.

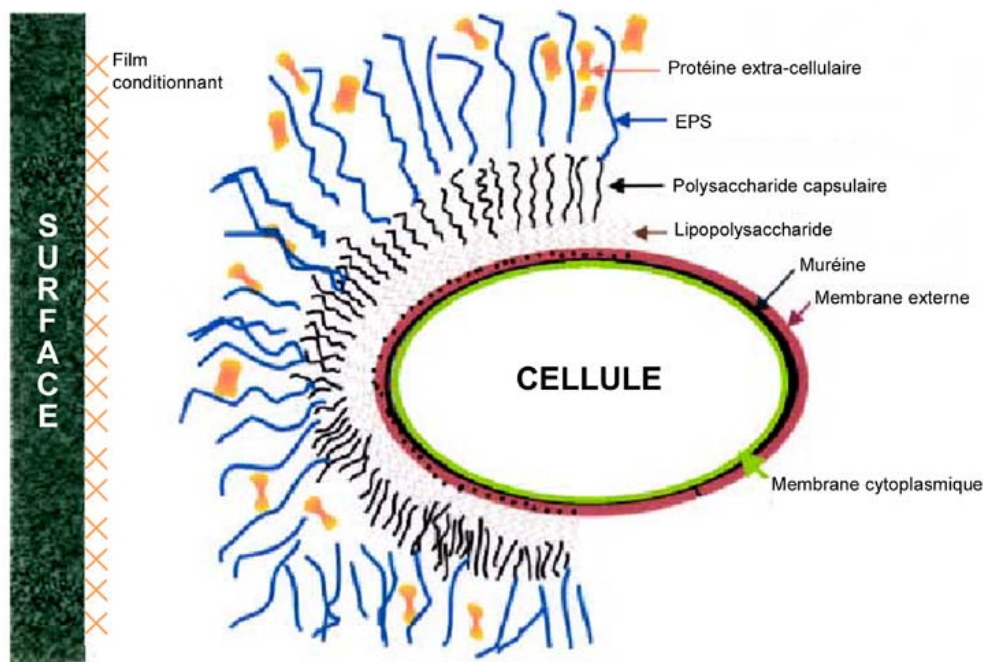


Figure 9 : Structures cellulaires conditionnant les premières étapes de l'adhésion (Flemming 2002)

Par ailleurs cette hydrophobicité varie aussi en fonction des souches étudiées. Ainsi les souches de *Klebsiella pneumoniae* exprimant le cluster de gènes *mrk* codant pour la synthèse de pili de type 3 sont-elles plus hydrophobes, plus adhérentes aux surfaces inertes (verre, polypropylène) et plus à même de former des biofilms que les souches n'exprimant pas ce cluster *mrk* (Di Martino *et al.* 2003).

Une même souche peut présenter un polymorphisme intraclonal : *Pseudomonas* sp. CM10 cultivée sur gélose forme d'abord des colonies mucoïdes qui génèrent ensuite une forme secondaire non mucoïde plus hydrophobe et plus mobile (Matz *et al.* 2002).

Différents facteurs peuvent modifier les charges de surface des micro-organismes et donc les interactions électrostatiques :

- phase de croissance dans laquelle se trouvent les micro-organismes : *Escherichia coli* porte une charge négative plus faible en phase exponentielle, alors que *Klebsiella aerogenes* a une charge plus importante pendant cette phase (James 1979);
- production d'appendices cellulaires tels que les fimbriae : *E. coli* cultivée sur gélose nutritive et produisant des fimbriae a une charge plus importante que la même bactérie n'en produisant pas (James 1982).

#### *III-1.2.1.b. Pili et flagelles*

En plus de modifier l'hydrophobicité et la charge des bactéries, les organites extra-cellulaires ont un rôle majeur dans deux processus essentiels lors de l'adhésion : la mobilité des bactéries et l'attachement aux surfaces. Les flagelles leur permettent de se déplacer en milieu liquide ou semi-solide et ils augmentent la probabilité d'accéder au support (Pratt *et al.* 1998). Certaines espèces bactériennes peuvent posséder plusieurs types de flagelles. C'est le cas pour des espèces appartenant au genre *Aeromonas* : elles possèdent un flagelle polaire exprimé de manière permanente qui assure la mobilité des cellules en temps normal, mais peuvent aussi exprimer des flagelles latéraux péritriches qui permettront une meilleure adhésion aux supports et aux cellules eucaryotes (Gavi *et al.* 2003). Les pili sont des adhésines majeures chez de nombreuses espèces bactériennes, leur petite taille leur permet de passer facilement la barrière de répulsion et d'assurer la liaison de la bactérie au support. Ils sont aussi impliqués dans certaines formes de mobilité des bactéries à la surface des supports solides ("twitching motility"), qui sont sans doute plus importantes dans les étapes de maturation du biofilm (Chiang *et al.* 2003).

#### III-1.2.2. Facteurs environnementaux

##### *III-1.2.2.a. Physico-chimie du milieu*

Les facteurs environnementaux : pH, température, composition en nutriments, force ionique du milieu, présence de biocides, ... ont une répercussion importante

sur les propriétés de surface et / ou sur l'expression d'organites extra-cellulaires des bactéries, donc sur l'adhésion aux supports. Jana *et al.* (2000) ont évalué l'hydrophobicité de 18 souches environnementales de *Pseudomonas fluorescens* (Jana *et al.* 2000). Les deux souches présentant des valeurs d'hydrophobicité extrêmes (minimum et maximum) ont été sélectionnées et les variations d'hydrophobicité ont été étudiées dans différentes conditions. Les auteurs ont ainsi démontré que les cellules étaient plus hydrophobes en début de phase de croissance qu'en phase stationnaire. L'hydrophobicité était augmentée en présence d'ions  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $K^+$ , et  $Mg^{2+}$ . Inversement, le passage d'une température de croissance de 30°C à des températures de 35 à 40°C entraînait une diminution de l'hydrophobicité. Cette diminution était aussi observée en cas d'exposition des cellules à la trypsine, à la pepsine, à la protéinase K, au dithiothreitol, au SDS, au Triton X-100 ou au Tween 80. Enfin, une privation nutritionnelle prolongée (60 jours) entraînait aussi une diminution de l'hydrophobicité.

#### III-1.2.2.b. Nature du support

Les mécanismes d'adhésion peuvent différer suivant la nature hydrophile ou hydrophobe de la surface. Dans le cas de surfaces hydrophobes (Teflon<sup>®</sup>, polyéthylène de haute densité), les interactions avec les parois elles aussi plutôt hydrophobes des bactéries constitueraient les principales forces à l'œuvre dans l'interaction surface / micro-organisme, et l'adhésion est généralement plus efficace que sur des surfaces hydrophiles (Faille *et al.* 2002). Dans le cas des surfaces hydrophiles (acier inoxydable), les interactions électrostatiques sont considérées comme dominantes et la charge des bactéries serait plus importante que les autres paramètres. Le caractère hydrophobe / hydrophile du milieu intervient aussi : Absolom *et al.* ont montré que des bactéries plus hydrophobes que le milieu dans lequel elles sont en suspension présentent une plus forte adhérence à une surface hydrophobe qu'à une surface hydrophile (Absolom *et al.* 1983). Inversement, si elles sont plus hydrophiles que le milieu environnant elle adhèrent mieux à une surface hydrophile.

### III-1.2.2.c. Hydrodynamique

L'hydrodynamique joue aussi un rôle important dans ces premières étapes et dans les étapes de maturation du biofilm. Dans des canalisations dans lesquelles l'eau circule de façon permanente, le transport des micro-organismes a lieu essentiellement par convection. Généralement, l'augmentation de la vitesse du flux parallèle au substrat a pour résultat une adhésion plus rapide des micro-organismes due à un transport de masse plus important, ceci malgré l'augmentation des forces de cisaillement (Bakker *et al.* 2003). Cependant au-delà d'une certaine limite ces forces de cisaillement peuvent devenir suffisantes pour empêcher l'adhésion, voire pour détacher les bactéries. Le régime du flux, laminaire ou turbulent (nombre de Reynolds  $> 1\ 400$ ), influence aussi l'architecture du biofilm.

### III-1.3. Constitution du biofilm (Fig. 10)

L'ancrage irréversible des premières espèces colonisatrices est facilité par la production d'exopolysaccharides (EPS) et aboutit à l'établissement d'un environnement plus riche (débris cellulaires, métabolites excrétés) permettant la colonisation par des espèces "copiotrophes" plus exigeantes en termes de nutriments (Szewzyk *et al.* 2000).

#### III-1.3.1. Exopolymères

Les premiers types d'exopolymères (EPM) produits sont les exopolysaccharides (EPS), qui sont essentiels au développement du biofilm (Danese *et al.* 2000). Ils forment une structure hautement hydratée, localement chargée qui constitue la matrice du biofilm et peut représenter 50 à 90% de la matière organique totale (Flemming *et al.* 2001). Elle assure la cohésion de la communauté microbienne, permet la création de gradients de nutriments et de métabolites ainsi que la formation de micro-environnements favorables à certaines espèces. La nature de ces EPS varie suivant les espèces bactériennes : sucres neutres, acides uroniques, acides hexuroniques, peuvent être retrouvés en proportions variables. Par ailleurs ces polysaccharides peuvent être porteurs de différents groupements organiques (acétyle, succinyle, pyruvyle) ou inorganiques (sulfate) qui modifieront

leurs propriétés physico-chimiques. D'autres types de macromolécules sont retrouvées dans cette matrice extra-cellulaire : lipides, protéines, acides nucléiques, en quantités et en proportions variables suivant les biofilms étudiés (Flemming *et al.* 2001). Les protéines peuvent être substituées par des acides gras ou glycosylées, elles contribuent aux propriétés hydrophobes de la matrice extra-cellulaire en raison de la présence d'acides aminés hydrophobes. Les acides uroniques, les acides aminés acides et les nucléotides porteurs de groupements phosphates sont impliqués dans les interactions électrostatiques avec des cations multivalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , ...) qui régulent et stabilisent la structure de la matrice (Chen *et al.* 2002). La quantité d'EPM produite ainsi que la nature et les propriétés de ces EPM varient en fonction des conditions environnementales : quantités de nutriments, présence de biocides, hydrodynamique (Michaud *et al.* 2003; Olofsson *et al.* 2003).

### III-1.3.2. Co-agrégation

Lorsque les premières espèces colonisatrices sont installées et que la matrice d'EPM se développe, de nouvelles espèces bactériennes vont pouvoir venir rejoindre la niche écologique. Certaines molécules présentes à la surface d'une bactérie peuvent être reconnues par des adhésines appartenant à une autre espèce, il peut alors se former un réseau de cellules interagissant, on parle de co-agrégation des bactéries en suspension. Lorsque cette interaction a lieu entre des bactéries en suspension et d'autres déjà attachées à un support on parle de co-adhésion (Rickard *et al.* 2003). Ces phénomènes, qui ont surtout été étudiés dans le cadre de la flore buccale, permettraient l'établissement de cette flore dans un ordre précis. Buswell *et al.* ont isolé une vingtaine d'espèces bactériennes à partir d'un biofilm cultivé dans de l'eau potable et ont pu observer qu'elles étaient toutes capables de co-agrégation avec au moins une autre espèce (Buswell *et al.* 1997). Par ailleurs une espèce : *Micrococcus luteus*, était capable de co-agrégation avec toutes les autres espèces. Les auteurs formulent l'hypothèse que cette espèce pourrait servir de "pont" entre les cellules constituant le biofilm. L'antigène 43 présent à la surface d'*E. coli* est une protéine appartenant à la famille des auto-transporteurs. Elle présente la particularité d'agir à la fois comme cible et comme récepteur de l'adhésion dans un phénomène d'auto-agrégation, son expression est phase-dépendante. Kjaergaard *et al.* ont montré que l'expression de cette protéine chez *Pseudomonas fluorescens* permet la

formation de biofilms mixtes *E. coli* + *P. fluorescens* dans lesquels les deux espèces sont en contact étroit (Kjaergaard *et al.* 2000). L'introduction de cet antigène dans des espèces d'intérêt pourrait permettre la production de biofilms stables utilisés pour dépolluer des effluents.

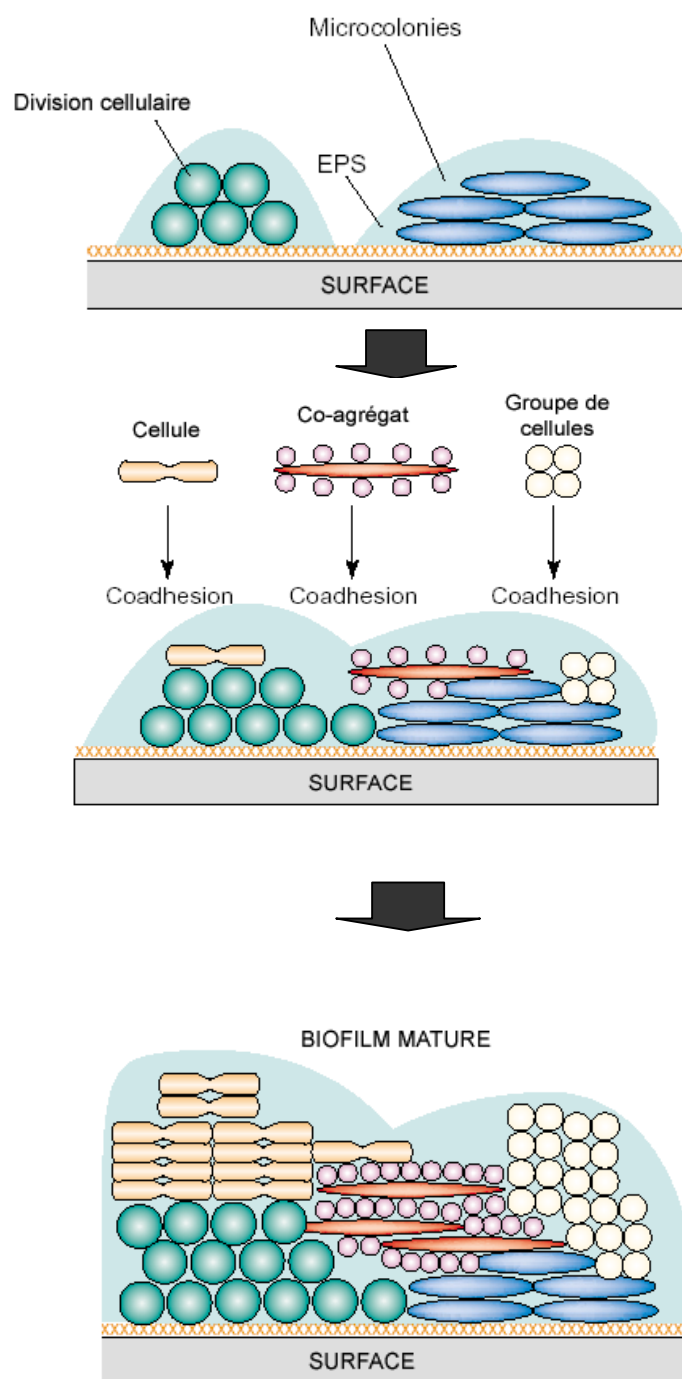


Figure 10 : Constitution et maturation du biofilm (Rickard *et al.* 2003)

### III-1.4. Ecologie du biofilm mature

#### III-1.4.1. Mobilité des bactéries

Le biofilm n'est pas une structure figée : plusieurs études montrent que les bactéries peuvent s'y déplacer. Stoodley *et al.* (1999) ont observé en microscopie confocale un biofilm polymicrobien soumis à un régime turbulent ( $Re > 1\ 400$ ) : ils ont démontré que des micro-colonies se déplaçaient à une vitesse maximale de  $800\ \mu\text{m} / \text{h}$  à la surface du biofilm (Stoodley *et al.* 1999). Le même type d'observation a été faite par Rice *et al.* sur un biofilm constitué de *P. aeruginosa* uniquement, sous un régime d'écoulement laminaire ( $Re = 5$ ). Certaines cellules métaboliquement plus actives migraient à une vitesse de  $1,5\ \mu\text{m} / \text{h}$  (Rice *et al.* 2003). L'étude de Klausen *et al.* a consisté à cultiver des biofilms composés de deux souches de *P. aeruginosa* : la souche sauvage mobile et un mutant pour les pili de type IV ayant perdu sa motilité. Des structures particulières, de type "champignon", se sont développées : la base de la structure était constituée de bactéries immobiles tandis que le chapeau était constitué de bactéries mobiles (Klausen *et al.* 2003) :

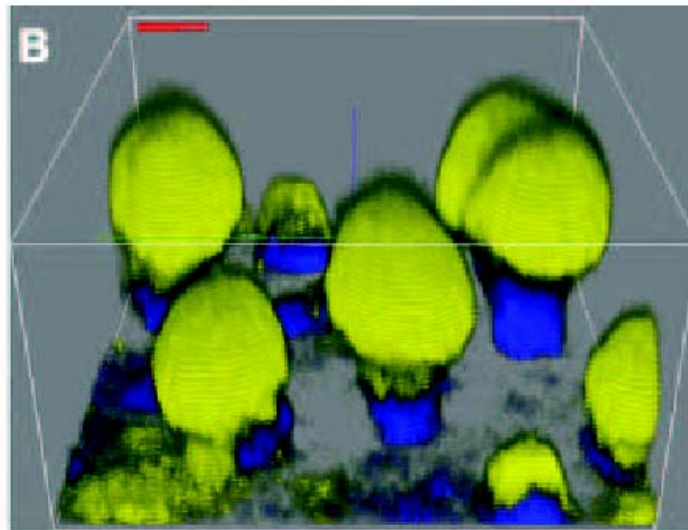


Figure 11 : Biofilm constitué d'une souche de *P. aeruginosa* mobile (jaune) et d'une souche mutante ayant perdu sa mobilité (bleue), Barre :  $20\ \mu\text{m}$  (Klausen *et al.* 2003)



## III-1.4.2. Transferts de gènes

L'échange de matériel génétique entre espèces au sein du biofilm est fréquent. Il contribuerait à la stabilisation du biofilm (Molin *et al.* 2003) et à la diffusion de la résistance aux traitements antibiotiques ou de désinfection (Schwartz *et al.* 2003). Le transfert conjugatif de plasmide a été étudié dans plusieurs types de biofilms simples, généralement composés de quelques espèces seulement. Ce type de transfert nécessitant un contact entre les cellules donneuses et réceptrices, son efficacité dépendrait du ratio surface / volume (Molin *et al.* 2003). Il pourrait donc intervenir lors des étapes précoces de la formation du biofilm (Licht *et al.* 1999), tandis que dans le cas de structures matures la conjugaison n'aurait lieu qu'avec les cellules de la couche extérieure du biofilm (Haagensen *et al.* 2002). *L. pneumophila* est capable de transfert conjugatif d'ADN chromosomique codant notamment pour le système *dot/ictm* impliqué dans l'expression de la virulence (Miyamoto *et al.* 2003).

L'autre mécanisme d'acquisition de matériel génétique (ADN chromosomal ou plasmidique) est la transformation, qui a lieu chez des bactéries compétentes. L'induction de cet état de compétence peut avoir lieu chez la plupart des espèces bactériennes et s'accompagne généralement d'une lyse d'une partie de la population et d'une libération d'ADN (Steinmoen *et al.* 2002). Dans le cas de *Streptococcus mutans*, Li *et al.* (2001) ont démontré que la transformation a lieu essentiellement lors des étapes précoces de la formation du biofilm (8 à 16 heures). Elle peut toucher jusqu'à 1% de la population, soit 10 à 600 fois plus que pour la transformation des bactéries en suspension. Elle est régulée par des signaux cellulaires dépendant de la quantité de bactéries présentes et permet le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques (Li *et al.* 2001). Hendrickx *et al.* ont mis en évidence une transformation plasmidique très efficace dans les biofilms d'*Acinetobacter* spp. (Hendrickx *et al.* 2003). Le taux de transfert le plus élevé était obtenu avec des biofilms jeunes dans lesquels les cellules se multipliaient activement, et avec des concentrations d'ADN transformant élevées. La présence de cellules dans la phase planctonique avait un impact négatif sur le taux de transfert. Stone *et al.* (1999) ont démontré que *L. pneumophila* est naturellement compétente pour la transformation par de l'ADN plasmidique ou de l'ADN chromosomique. Les pili de type IV, qui sont aussi impliqués dans l'attachement aux cellules eucaryotes et aux protozoaires, sont nécessaires à l'expression de cette compétence (Stone *et al.* 1999).

## III-1.4.3. Interactions métaboliques et cataboliques

La densité importante des cellules au sein du biofilm favorise la création de gradients de métabolites, et le développement à proximité d'espèces capables d'utiliser ces métabolites. L'étude de Christensen *et al.* (2002) a porté sur un biofilm composé de *P. putida* et d'*Acinetobacter* spp. (Christensen *et al.* 2002). Ces deux espèces sont capables d'utiliser l'alcool benzylique comme substrat pour leur croissance. Si elles sont cultivées ensemble en milieu liquide en présence de ce substrat, *Acinetobacter* spp. devient rapidement dominante. En revanche, le développement de biofilms mixtes en présence de ce même substrat conduit à une dominance de *P. putida*. En effet, *Acinetobacter* spp. produit un métabolite intermédiaire qui est utilisé par *P. putida*. Le développement sous forme de biofilm permet l'organisation spatiale de la population : *Acinetobacter* spp. est en contact avec la phase planctonique dans laquelle se trouve le substrat, *P. putida* est localisée dans les couches inférieures du biofilm où elle bénéficie du métabolite sécrété par *Acinetobacter* spp. Cette organisation permet la co-existence des deux espèces, tandis qu'en milieu liquide la cinétique de dégradation de l'alcool benzylique par *Acinetobacter* spp. est beaucoup plus rapide que pour *P. putida*, conduisant à la quasi-disparition de cette dernière.

L'association peut aussi résulter de la détoxification d'un produit par une espèce résistante, permettant l'installation et le développement d'espèces normalement sensibles. Cowan *et al.* ont étudié des biofilms composés de deux espèces : *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas* spp. Ils les ont exposés à diverses concentrations de *p*-crésol, produit toxique pour *Pseudomonas* spp. mais pas pour *P. putida* qui est capable de le dégrader (Cowan *et al.* 2000). Les auteurs ont démontré que l'association des deux espèces au sein du biofilm permet la croissance de *Pseudomonas* spp. à proximité de *P. putida* qui détoxifie le *p*-crésol. Leriche *et al.* ont étudié l'association entre *Staphylococcus sciuri* et *Kocuria* spp. adhérant à de l'acier inoxydable et soumis quotidiennement à l'action d'une solution alcaline chlorée (Leriche *et al.* 2003). Ils ont montré que quand le milieu est suffisamment riche pour permettre la synthèse et la sécrétion d'exoprotéines par *S. sciuri*, cette espèce pourtant sensible au biocide devient dominante par rapport à *Kocuria* spp. qui est résistante. La visualisation du biofilm en début de traitement montre des cellules de *S. sciuri* formant un "anneau" autour des micro-colonies de *Kocuria* spp., il semblerait

donc que durant les premiers jours du traitement *Kocuria* spp. protège *S. sciuri* de l'action du traitement. Cet effet protecteur serait dû au fait que *Kocuria* spp. étant une espèce aérobie stricte, la concentration en oxygène dissout autour des micro-colonies serait faible, donc les dommages oxydatifs entraînés par le dérivé chloré seraient diminués dans cette zone. L'espèce *S. sciuri* étant aéro-anaérobie, elle coloniserait cette niche particulière sous la pression du traitement. Au fur et à mesure de son développement, elle sécrèterait des quantités croissantes d'exoprotéines, entraînant une forte demande en chlore, donc une diminution de la concentration en chlore actif.

#### III-1.4.4. Biosurfactants

Les biosurfactants sont sécrétés par de nombreuses espèces bactériennes. Ces molécules présentent à la fois des groupements hydrophiles et hydrophobes, elles peuvent donc s'adsorber sur des interfaces de natures variées et en modifier les propriétés. Les effets attribués aux biosurfactants sont nombreux (Ron *et al.* 2001) :

- augmentation de la dispersion et de la biodisponibilité des substrats insolubles grâce à leur pouvoir émulsifiant (Garcia-Junco *et al.* 2001),
- fixation des métaux lourds (Teitzel *et al.* 2003),
- intervention dans la pathogénicité chez certaines espèces : le rhamnolipide sécrété par *Burkholderia pseudomallei* entraîne un effet cytotoxique et une diminution de l'internalisation par les macrophages (Hausler *et al.* 2003),
- activité antimicrobienne,
- régulation de l'attachement et du détachement des bactéries aux surfaces (inhibition de la formation de biofilms par la surfactine chez *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (Mireles *et al.* 2001)).

Il semblerait que les biosurfactants aient un rôle important dans l'élaboration et le maintien de l'architecture des biofilms. Ainsi Davey *et al.* (2003) ont observé qu'un mutant de *P. aeruginosa* déficient dans la production de rhamnolipide est incapable de maintenir des canaux aqueux non colonisés au sein du biofilm, ce qui résulte dans la formation d'un biofilm dense et homogène, au sein duquel les bactéries ont moins facilement accès aux nutriments (Davey *et al.* 2003). Inversement, un mutant

produisant du rhamnolipide en quantité excessive est incapable de former un biofilm mature, cet effet est aussi observé par ajout de rhamnolipide purifié dans le milieu.

Dans certains cas, il semblerait que le biosurfactant sécrété par une espèce soit capable de se lier à la surface d'autres espèces et de modifier leur caractère hydrophile / hydrophobe. Osterreicher *et al.* (2000) ont ainsi démontré que l'émulsifiant produit par *Acinetobacter radioresistens* peut se lier à la surface de *Sphingomonas paucimobilis* ou de *Acinetobacter calcoaceticus*, diminuant ainsi l'hydrophobicité de surface de ces cellules (Osterreicher-Ravid *et al.* 2000). Les auteurs présumant que dans les biofilms ce type d'interaction peut avoir un rôle important dans la régulation de la composition et du comportement des populations bactériennes.

### **III-1.5. Facteurs environnementaux influençant le biofilm mature**

Les facteurs environnementaux ont une action importante sur la structure physique du biofilm et sur le comportement des espèces qui le composent. Ces facteurs sont nombreux et variés, nous ne détaillerons ci-dessous que les plus importants.

#### **III-1.5.1. Nutriments**

Le carbone organique dissous biodégradable (CODB) et le carbone organique assimilable (COA) sont des paramètres importants, reflets de la quantité de carbone utilisable par les micro-organismes. Ces paramètres prennent en compte les acides humiques (hydrophobes, généralement non biodégradables), les acides carboxyliques, les acides aminés, les hydrates de carbone, ainsi qu'un certain nombre de composés non identifiés présents à l'état de traces (Sibille 1998). Les valeurs seuils en-dessous desquelles la croissance microbienne dans les réseaux d'eau potable est limitée varient suivant les travaux. Différentes études menées par LeChevallier *et al.* rapportent une valeur seuil de 50 à 100 µg / L de COA permettant de limiter la croissance des bactéries coliformes dans les réseaux d'eau potable (LeChevallier *et al.* 1991; LeChevallier *et al.* 1996). L'étude de Niquette *et al.* (2001) recommande une valeur de CODB inférieure à 0,25 mg / L en sortie d'usine de potabilisation afin de limiter la croissance bactérienne (Niquette *et al.* 2001). Les

études portant sur le traitement des eaux par biofiltration afin de diminuer la quantité de carbone assimilable par les bactéries du réseau montrent une efficacité limitée aux bactéries circulantes. Dans certains cas la croissance des biofilms est ralentie mais la quantité de biomasse finit par être la même que dans le cas d'une eau non biofiltrée (Norton *et al.* 2000). Dans d'autres cas la croissance est ralentie et la quantité de biomasse fixée réduite d'un facteur 5 à 10 (Volk *et al.* 1999). Des procédés nettement plus drastiques de suppression du CODB, tels que la nanofiltration, diminuent aussi la quantité de biomasse présente mais n'empêchent pas la formation d'un écosystème stable (Sibille *et al.* 1997).

D'autres éléments sont indispensables à la croissance bactérienne. Le ratio carbone / azote / phosphore nécessaire pour cette croissance est de 100C / 10N / 1P (Chandy *et al.* 2001). Dans certains cas le phosphore peut devenir l'élément limitant : les eaux de surface utilisées dans certaines régions (Finlande, Norvège, Japon, ...) pour la production d'eau potable sont très riches en acides humiques et très pauvres en phosphore. Plusieurs études ont démontré que dans ces eaux pour lesquelles la concentration de phosphore est inférieure à 2 µg / L, l'ajout de phosphore (P) entraîne une augmentation d'un à deux log de la croissance bactérienne (Miettinen *et al.* 1997; Lehtola *et al.* 2002).

### III-1.5.2. Matériaux

Alors que durant la phase primaire d'adhésion c'est le caractère hydrophile / hydrophobe du matériau qui est primordial, c'est la capacité de ce support à relarguer des composés assimilables par la biomasse qui devient importante lors de la maturation. En effet la plupart des matériaux utilisés dans les réseaux de distribution relarguent des molécules en quantités plus ou moins importantes, et qui sont plus ou moins biodégradables par la flore microbienne. Ces relarguages sont aussi influencés par la corrosion : un matériau très corrodé relargue de la matière et il apparaît à sa surface des anfractuosités qui pourront être colonisées, formant ainsi des niches écologiques protégeant la biomasse fixée de l'action des désinfectants et des forces de cisaillement. Certains matériaux tels que le cuivre ont un caractère bactériostatique à cause des ions toxiques qu'ils libèrent. Dans leur étude datant de 2000, Niquette *et al.* ont comparé la colonisation de différents types de matériaux exposés à de l'eau potable. Les matériaux les moins colonisés étaient le

polyéthylène et le PVC, suivis de l'acier, de l'amiante-ciment et du fer-ciment, et enfin de l'acier-goudron et du fer (Niquette *et al.* 2000). Une étude similaire menée sur pilote par Chang *et al.* a permis d'aboutir au classement suivant : PVC < acier galvanisé < fer (Chang *et al.* 2003). Rogers *et al.* (1994) ont comparé la formation de biofilms contaminés par *L. pneumophila* sur différents types de matériaux (Rogers *et al.* 1994b). Par ordre de colonisation croissante, les matériaux testés étaient : verre < acier inoxydable < polypropylène < PVC < acier mou < polyéthylène < polymère d'éthylène-propylène < latex. Les auteurs ont aussi mesuré les quantités de COT relarguées dans l'eau par ces matériaux (surface de 3 cm<sup>2</sup> dans 10 mL d'eau). Ils rapportent des valeurs très élevées supérieures à 150 mg / L pour le polyéthylène, l'éthylène-propylène et le latex, tandis que ces valeurs sont inférieures à 6 mg / L pour les autres matériaux. Dans une étude similaire avec d'autres matériaux les auteurs ont rapporté les taux de colonisation suivants : cuivre < polybutylène < PVC (Rogers *et al.* 1994a).

### III-1.5.3. Température

La température de l'eau est un facteur essentiel dans le développement des biofilms en réseau d'eau potable puisqu'elle affecte un grand nombre de paramètres physico-chimiques : efficacité des procédés de potabilisation, taux de croissance des bactéries, efficacité des traitements de désinfection, taux de corrosion, hydraulique et temps de séjour de l'eau dans le réseau (diminué en Été) (LeChevallier *et al.* 1996). Dans le réseau de distribution cette température ne peut pas être régulée, c'est donc un paramètre critique gouvernant la contamination de l'eau. De manière générale, une valeur supérieure à 15°C peut être considérée comme favorisant la croissance bactérienne (LeChevallier *et al.* 1996).

### III-1.5.4. Hydrodynamique

La dynamique du flux d'eau influence directement la formation, la maturation et le détachement du biofilm. Une augmentation de la vitesse de flux induit une hausse des forces de cisaillement, une dilution de la concentration locale des métabolites bactériens, mais aussi une augmentation des apports de nutriments et de désinfectants. De manière générale l'accumulation de biofilm est plus faible en régime turbulent. Dans ces conditions il peut y avoir formation de structures

particulières : micro-colonies orientées dans le sens du flux, tandis que des bactéries isolées se déplacent à la surface du support (Purevdorj *et al.* 2002).

### III-1.6. Détachement du biofilm et mort cellulaire

Le détachement des cellules du biofilm est un phénomène complexe, peu exploré, faisant intervenir de nombreux mécanismes simultanément. Ceux du quorum sensing, déjà cités ci-dessus, sont sans doute impliqués *via* la régulation de l'expression de gènes, notamment ceux impliqués dans la synthèse du rhamnolipide chez *P. aeruginosa* (Davey *et al.* 2003). La diminution de la quantité de nutriments pourrait aussi entraîner un détachement des cellules (Sawyer *et al.* 2000). Allison *et al.* ont montré que dans un biofilm constitué de l'espèce *P. fluorescens* la diminution de la quantité de nutriments entraîne la sécrétion d'une polysaccharide lyase qui dégrade la matrice du biofilm, facilitant ainsi la libération des bactéries (Allison *et al.* 1998). Chez *E. coli* K-12, la protéine régulatrice CsrA ("carbon storage regulator A") sert d'activateur de la dispersion des biofilms dans des conditions de culture variées (Jackson *et al.* 2002). Sur-exprimée chez *E. coli* ou chez d'autres entérobactéries, cette protéine entraîne une inhibition de la formation des biofilms. Chez la souche sauvage, l'expression de la protéine diminue lors du développement du biofilm, puis augmente dans le biofilm mature, entraînant un détachement des cellules. L'expression de CsrA est liée à la synthèse du glycogène, donc à la quantité de nutriments disponibles pour permettre cette synthèse. Par ailleurs les auteurs ont observé que l'addition de glucose au milieu bloque la dispersion du biofilm *via* CsrA. L'hydrodynamique a aussi un rôle important : Stoodley *et al.* ont montré qu'en cas de régime turbulent de gros amas de cellules peuvent se détacher (Stoodley *et al.* 2001).

La mort des cellules du biofilm fait aussi partie du processus de renouvellement et de dispersion de la biomasse. Un mécanisme original régissant l'autorégulation de la population des biofilms est proposé par Webb *et al.* (2003). Les auteurs ont observé que dans un biofilm constitué de l'espèce *P. aeruginosa* la mort d'un grand nombre de cellules intervient régulièrement. Dans les effluents provenant du biofilm ils ont détecté un phage filamenteux capable d'infecter et de lyser une partie de la population du biofilm, tandis que l'autre partie des cellules semble résistante. Ce phage étant présent sous forme de prophage dans le génome de *P.*

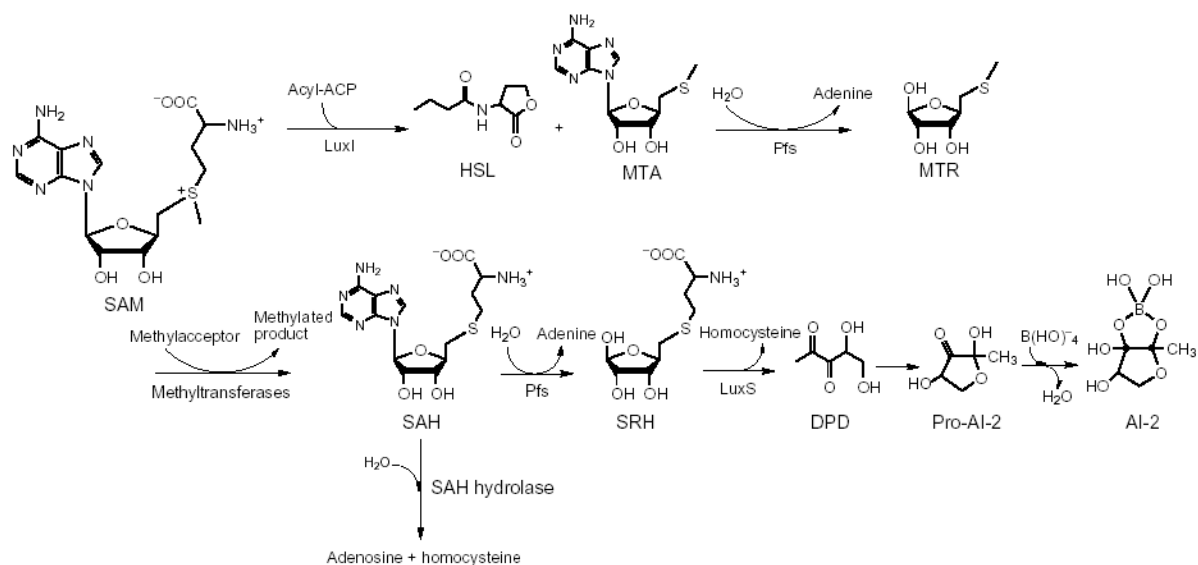
*aeruginosa*, les auteurs formulent l'hypothèse qu'il constituerait un mécanisme de différenciation des cellules à l'intérieur des micro-colonies, facilitant la dispersion d'une sous-population résistant à la lyse (Webb *et al.* 2003).

## III-2. COMMUNICATION INTER-CELLULAIRE

### III-2.1. Introduction

La découverte de signaux de communication extra-cellulaires sécrétés par de nombreuses espèces bactériennes est récente. Ces molécules sont capables de moduler l'expression des gènes chez des bactéries de la même espèce mais aussi chez des bactéries appartenant à des espèces différentes (Fong *et al.* 2001; Riedel *et al.* 2001), voire même chez des espèces eucaryotes (Mathesius *et al.* 2003; Sperandio *et al.* 2003). Le mécanisme de quorum-sensing repose sur l'interaction de ces signaux moléculaires diffusibles avec un régulateur transcriptionnel protéique qui couple l'expression de certains gènes avec la densité de la population bactérienne. Différentes familles de molécules signal ont été identifiées, dont deux familles retrouvées fréquemment chez de nombreuses espèces : les auto-inducteurs de type 1 (AI-1) et les auto-inducteurs de type 2 (AI-2). Ces deux types de molécules sont produits à partir d'un substrat commun : la S-adénosylméthionine (Xavier *et al.* 2003) (Fig. 12). Les AI-1 sont essentiellement retrouvés chez des espèces Gram – appartenant aux protéobactéries (de Kievit *et al.* 2000; Whitehead *et al.* 2001) (Tab. VII), tandis que les AI-2 semblent plus universels (Tab. VIII).





**Figure 12 : Biosynthèse des homosérines lactones et des auto-inducteurs de type 2 (Xavier et al. 2003)**

Les deux types de molécules dérivent de la S-adénosylméthionine (SAM). Les enzymes de type LuxI forment les AI-1 à partir de la SAM et de protéines acyl-acyl-transporteurs spécifiques (Acyl-ACPs). Ces réactions produisent aussi la méthylthioadénosine (MTA) qui est ensuite transformée par la 5-méthylthioadénosine/S-adénosylhomocystéine nucléosidase (Pfs) en méthylthioribose (MTR). De nombreuses méthyltransférases agissent sur la SAM et transfèrent un groupe méthyl sur des substrats variés. Ces réactions produisent aussi la S-adénosylhomocystéine (SAH). La Pfs hydrolyse l'adénine de la SAH pour former la S-ribosylhomocystéine (SRH). LuxS agit sur la SRH et produit la 4,5-dihydroxy 2,3-pentanedione (DPD) et l'homocystéine. La DPD se cyclise pour former le pro-AI<sub>2</sub>, auquel est ajouté un atome de bore pour former l'AI-2. Chez les bactéries ne possédant pas LuxS, la SAH est détoxifiée grâce à une hydrolase qui la convertit en adénosine et homocystéine.

**Tableau VII : Homologues LuxR/LuxI, AI-1 synthétisés et phénotype régulé chez un certain nombre d'espèces bactériennes (de Kievit et al. 2000)**

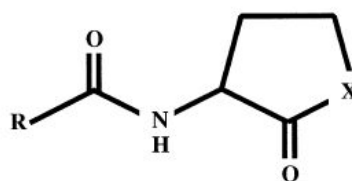
Espèces	Homologues LuxR/I	AHL majeure	Phénotype régulé
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AhyR, Ahyl	C4-HSL	Protéase extra-cellulaire, formation du biofil
<i>Aeromonas salmonicida</i>	AsaR, Asal	C4-HSL	Protéase extra-cellulaire
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraR, Tral	3-oxo-C8-HSL	Conjugaison
<i>Burkholderia cepacia</i>	CepR, Cepl	C8-HSL	Protéase, sidérophore
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviR, Cvil	C6-HSL	Antibiotiques, violacéine, exoenzymes, cyanide
<i>Enterobacter agglomerans</i>	EagR, Eagl	3-oxo-C6-HSL	Inconnu
<i>Erwinia carotovora</i> subsp <i>carotovora</i>	CarR, ExpR Expl (Carl)	3-oxo-C6-HSL	Carbapeneme, exoenzymes
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	ExpR, Expl (EchR, EchI)	3-oxo-C6-HSL	Pectinases
<i>Escherichia coli</i>	SdiA	Inconnue	Division cellulaire
<i>Nitrosomas europaea</i>	Unknown	3-oxo-C6-HSL	Emergence de la phase lag
<i>Obesumbacterium proteus</i>	OprR, OprI	3-oxo-C6-HSL	Inconnu
<i>Pantoea stewartii</i>	EsaR, Esal	3-oxo-C6-HSL	Exopolysaccharide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasR, LasI RhIR, RhII (VsmR, Vsml)	3-oxo-C12-HSL C4-HSL	Exoenzymes, Xcp, formation du biofilm, RhIR, espaces inter-cellulaires Exoenzymes, cyanide, RpoS, lectines, pyocyanine, rhamnolipide, pili de type 4
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	PhzR, PhzI	C6-HSL	Phenazine
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PhzR, PhzI	Inconnue	Phenazine
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	PsyR, Psyl	Inconnue	Inconnu
<i>Ralstonia solanacearum</i>	SolR, SolI	C8-HSL	Inconnu
<i>Rhizobium etli</i>	RaiR, Rail	Inconnue	Restriction du nombre de nodules
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RhIR	3-hydroxy-7-cis-C14-HSL	Nodulation, bacteriocine, survie en phase stationnaire
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerR, CerI	7-cis-C14-HSL	Echappement
<i>Serratia liquefaciens</i>	SwrR, SwrI	C4-HSL	Swarming, protéase
<i>Vibrio anguillarum</i>	VanR, VanI	3-oxo-C10-HSL	Inconnu
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxR, LuxI	3-oxo-C6-HSL	Bioluminescence
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Unknown	3-hydroxy-C4-HSL or an agonist	Virulence, lipase
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YenR, YenI	C6-HSL	Inconnu
<i>Yersinia pestis</i>	YpeR, Ypel	Inconnue	Inconnu
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YpsR, YpsI YtbR, Ytbi	3-oxo-C6-HSL C8-HSL	Motilité, clumping Inconnu
<i>Yersinia ruckeri</i>	YukR, YukI	Inconnue	Inconnu

Tableau VIII : Phénotype et gènes régulés par *luxS* (AI-2) chez un certain nombre d'espèces bactériennes (Xavier *et al.* 2003)

Espèce	Fonctions régulées par <i>luxS</i>	Gènes régulés par <i>luxS</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Facteurs de virulence : leucotoxine, acquisition du fer	<i>afuA</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Expression de nombreuses protéines sur gels bidimensionnels : ErpA, -I et -N	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Motilité	
<i>Clostridium perfringens</i>	Facteurs de virulence : toxines alpha, kappa, theta	<i>pfo</i>
<i>Escherichia coli</i> W3110	Division cellulaire, traitement de l'ADN, forme de la cellule et morphologie	242 gènes (puce ADN)
<i>Escherichia coli</i> EHEC (O157:H7)	Facteurs de virulence : sécrétion de type II, toxine Shiga, flagelles, motilité, division cellulaire	opéron LEE, <i>stx</i> , <i>ptsN</i> , <i>sula</i> , <i>flhD</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>motA</i> , <i>qseA</i> , <i>qseBC</i> , 404 gènes
<i>Escherichia coli</i> EPEC (O127:H6)	Motilité (expression du flagelle)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	Bactériémie	
<i>Photobacterium luminescens</i>	Biosynthèse du carbapénème	<i>cpm</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Facteurs de virulence : protéase, hémagglutinine, acquisition de l'hème	<i>uvrB</i> , <i>hasF</i>
<i>Salmonella typhi</i>	Biofilms	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Système de transport AI-2 ABC	<i>IsrACDBFGE</i>
<i>Shigella flexneri</i>	Facteur de transcription impliqué dans la virulence	<i>virB</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Facteurs de virulence : hémolysine protéase	<i>speB</i> , <i>sagA</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	Facteurs de virulence : toxine cholérique, pilus	<i>tcpP</i> , <i>tcpA</i> , <i>ctxAB</i> env. 70 gènes de virulence (puce ADN)
<i>Vibrio harveyi</i>	Production de lumière, morphologie des colonies	<i>luxCDABE</i>

### III-2.2. Auto-inducteurs de type 1

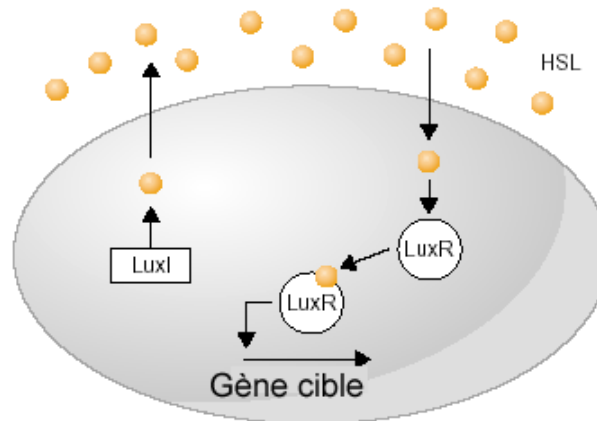
Les auto-inducteurs de type 1 sont composés d'un noyau lactone sur lequel est greffée une chaîne *N*-acyl dont la longueur varie de 4 à 16 carbones, et qui peut être substituée par un –OH, un –O ou un –H en position 3 (Fuqua *et al.* 2002)(Fig. 13). Ils ont pour la première fois été mis en évidence chez *Vibrio fischeri*, espèce symbiotique de nombreux poissons et calmars. Ces bactéries colonisent l'organe lumineux de leur hôte, à l'intérieur duquel elles peuvent se multiplier en grand nombre. Quand la population bactérienne, et donc la quantité de molécule signal, sont suffisamment importantes il y a activation de la luminescence de *V. fischeri*. Chez cette espèce l'AI-1 (3-oxo-C6-homosérine lactone) est synthétisé grâce au produit du gène *luxI*, et il diffuse librement à travers les membranes de la cellule. Le récepteur est encodé par *luxR*, c'est un activateur transcriptionnel cytoplasmique.



R	X	Nom chimique	Abbreviation
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -Butanoyl-L-homoserine lactone	BHL
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	S	<i>N</i> -Butanoyl-L-homocysteine thiolactone	BHT
CH <sub>3</sub> COCH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -(3-Oxobutanoyl)-L-homoserine lactone	OBHL
PhCH <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -Benzoylacetyl-L-homoserine lactone	BAHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	O	<i>N</i> -Hexanoyl-L-homoserine lactone	HHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	S	<i>N</i> -Hexanoyl-L-homocysteine thiolactone	HHT
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-L-homoserine lactone	OHHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-D-homoserine lactone	(D)OHHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub>	S	<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-L-homocysteine thiolactone	OHHT
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	O	<i>N</i> -Octanoyl-L-homoserine lactone	OHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COCH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -(3-Oxo-octanoyl)-L-homoserine lactone	OOHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	O	<i>N</i> -Decanoyl-L-homoserine lactone	DHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COCH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -(3-Oxodecanoyl)-L-homoserine lactone	ODHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	O	<i>N</i> -Dodecanoyl-L-homoserine lactone	dDHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COCH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone	OdDHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	O	<i>N</i> -Tetradecanoyl-L-homoserine lactone	tDHL
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COCH <sub>2</sub>	O	<i>N</i> -(3-Oxotetradecanoyl)-L-homoserine lactone	OtDHL

Figure 13 : Structure des auto-inducteurs de type 1 (McClellan *et al.* 1997)

Une fois l'AI-1 fixé à LuxR, le complexe formé se lie à une séquence particulière de 20 paires de bases ("lux box") située en amont de la séquence codant pour le premier gène impliqué dans l'opéron codant pour la luminescence, et interagit avec l'ARN polymérase pour stimuler la transcription de l'opéron (Fig. 14). La luminescence confère un avantage à l'hôte car elle lui permet de chercher des proies.



**Figure 14 : Schéma du système de régulation LuxI/LuxR (Xavier *et al.* 2003)**

Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes effecteur / récepteur coexistent et interviennent dans la régulation de l'expression d'un très grand nombre de gènes (Fig. 15). Le système LasR-LasI fait intervenir une 3-oxo-C12-homosérine lactone, le système RhIR-RhII une C4-homosérine lactone. Ces deux systèmes interagissent, et il existe une hiérarchie dans cette interaction : LasR-LasI est requis pour l'induction de RhIR-RhII et certains promoteurs reconnus par RhIR peuvent aussi être reconnus par LasR (Fuqua *et al.* 2002). Les AI-1 ont un rôle essentiel dans la régulation de la virulence de la bactérie *in vivo* : chez le modèle animal, des mutants Acyl Homosérine Lactone (AHL) sont nettement moins virulents lors d'essais d'infections pulmonaires ou d'infections sur brûlures. Par ailleurs les AHLs sécrétées par *P. aeruginosa* semblent capables de directement moduler la réponse immunitaire de l'animal. Elles ont été détectées sur des prélèvements cliniques réalisés chez l'Homme lors de septicémies chez des patients présentant des brûlures sévères et lors d'infections pulmonaires aiguës (Rumbaugh *et al.* 2000). Enfin lors de l'infection expérimentale de *Dictyostelium discoideum* par *P. aeruginosa*, les mutants *rhl* - présentent aussi une virulence atténuée par rapport à la souche sauvage, tandis que



### III-2.3. Auto-inducteurs de type 2

La découverte des auto-inducteurs de type 2 est plus récente, elle a été faite chez l'espèce *Vibrio harveyi* chez qui elle co-existe et interagit avec un système de régulation *via* un AI-1 pour contrôler la production de luminescence (Surette *et al.* 1999) (Fig. 16). Sa synthèse est dépendante du gène *luxS*, elle varie en fonction de la phase de croissance de la bactérie : généralement maximale en début de phase de croissance, la quantité d'AI-2 sécrétée diminue jusqu'à disparaître en phase post-exponentielle. La source de carbone joue aussi un rôle important : l'ajout de glucose dans le milieu de culture permet la production d'AI-2 par *E. coli* et *S. typhimurium* (Surette *et al.* 1998). Contrairement aux AI-1 qui présentent des structures différentes suivant les espèces bactériennes chez qui ils sont isolés, la structure de l'AI-2 semble conservée. Cette particularité en ferait un signal universel synthétisé et reconnu par de nombreuses espèces. Le précurseur de l'AI-2 est synthétisé à partir de la S-adénosylméthionine, c'est l'incorporation de bore en fin de réaction de synthèse qui permet la création de l'AI-2 (Xavier *et al.* 2003). Bien qu'un certain nombre de gènes régulés par AI-2 aient été identifiés chez plusieurs espèces, les cascades de signalisation impliquées sont encore mal connues. Chez *V. harveyi*, cette cascade fait intervenir plusieurs complexes (LuxP, LuxQ, LuxU, LuxO et LuxR) couplés à des phosphorylations – déphosphorylations successives. Des études réalisées chez *E. coli* grâce à des puces à ADN ont permis de mettre en évidence 242 gènes (soit 5,6% du génome d'*E. coli*) dont l'expression était modulée suite à l'augmentation de la concentration d'AI-2 (DeLisa *et al.* 2001).

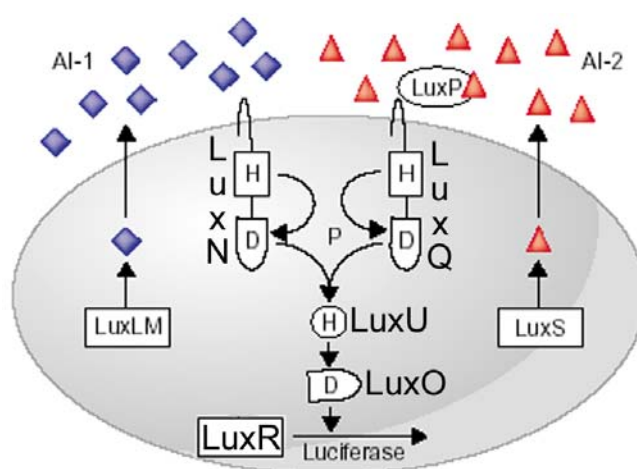


Figure 16 : Coexistence et interaction des systèmes AI-1 et AI-2 chez *V. harveyi*, d'après (Xavier *et al.* 2003) et (Schauder *et al.* 2001)

### III-2.3. Quorum-sensing et biofilms

L'importance de ces deux types d'auto-inducteurs dans la formation et la maturation des biofilms a été mise en évidence chez un certain nombre d'espèces en culture pure. Par ailleurs des AI-1 ont été détectés au sein de biofilms complexes provenant de différents écosystèmes : pierres immergées dans des rivières (McLean *et al.* 1997), canalisations d'égouts (Vincke *et al.* 2001), biofilms provenant de cathéters urétraux (Stickler *et al.* 1998), de lentilles de contact (Zhu *et al.* 2001) ...

#### III-2.3.1. Auto-inducteurs de type 1

##### III-2.3.1.a. Régulation du phénotype

Lors de la formation du biofilm, la quantité d'AI-1 ne peut être suffisante pour déclencher l'activation de l'expression de gènes que lorsque les bactéries sont déjà nombreuses, donc au sein d'un biofilm mature. Davies *et al.* (1998) ont observé la formation de biofilms chez des mutants *lasI* et *rhII* de *P. aeruginosa* (Davies *et al.* 1998), montrant que lors des étapes précoces de la formation du biofilm les deux mutants étaient capables d'adhérer au support et de former des micro-colonies semblables à celles observées avec la souche sauvage. En revanche, pendant la phase de maturation seul le mutant *rhl* formait des biofilms semblables à ceux observés avec la souche sauvage, tandis que le mutant *lasI* formait des biofilms moins épais et plus denses, sensibles à l'action du SDS 0,2%. L'addition d'AI-1 dans le milieu restaurait le phénotype sauvage. L'étude de Sauer *et al.* (2002) a permis de distinguer cinq étapes différentes lors du développement de *P. aeruginosa* sous forme de biofilms en milieu minimum : l'attachement réversible, l'attachement irréversible, deux étapes de maturation et la dispersion (Sauer *et al.* 2002). A chacune de ces étapes correspond l'expression de phénotypes particuliers, différant entre eux par l'expression d'au moins 500 protéines. Par ailleurs les auteurs ont aussi observé que l'expression de *lasI* est plus importante dans les étapes de maturation du biofilm. Le mutant *lasI* – présente une matrice exo-polysaccharidique nettement différente de celle observée chez la souche sauvage : EPS essentiellement en surface des cellules, ne remplissant pas les espaces interstitiels du biofilm (réduits chez le mutant *lasI* -). L'étude récente de Davey *et al.* confirme et apporte des explications à ces observations. Elle semble démontrer que la



différentiation du biofilm en une forme mature "vascularisée" grâce à la formation de canaux aqueux serait due à la sécrétion de rhamnolipide (biosurfactant) par *P. aeruginosa* (Davey *et al.* 2003). Le rhamnolipide ne serait pas nécessaire à la formation de canaux, en revanche il empêcherait la colonisation de ces canaux par les cellules en phase planctonique et pourrait avoir un rôle dans le détachement de micro-colonies du biofilm. L'expression du gène codant pour le rhamnolipide étant régulée par les systèmes RhII-RhIR et LasI-LasR, ces observations permettent d'expliquer les études précédentes (Espinosa-Urgel 2003).

L'importance des AI-1 dans la formation des biofilms a été mise en évidence chez d'autres espèces : *Chromobacterium violaceum* (Martinelli *et al.* 2002), *Aeromonas hydrophila* (Lynch *et al.* 2002), *Burkholderia cepacia* (Conway *et al.* 2002), ... Ils interviennent aussi dans les étapes de maturation des biofilms.

#### *III-2.3.1.b. Communication inter-espèces*

Riedel *et al.* ont mis en évidence la possibilité d'une communication entre espèces bactériennes d'un biofilm via un AI-1. Ils ont étudié des biofilms intra-pulmonaires chez la souris. Ces biofilms étaient constitués de deux espèces : *P. aeruginosa* et *B. cepacia* (Riedel *et al.* 2001), qui sont fréquemment isolées lors d'infections pulmonaires chez des patients atteints de cystite fibreuse. Lors de ces infections, *P. aeruginosa* se développe dans les sécrétions bronchiques et forme des structures apparentées aux biofilms, sécrétant notamment des homosérines lactones de type 1 (Singh *et al.* 2000). Les auteurs ont montré que les homosérines sécrétées par *P. aeruginosa* peuvent réguler l'expression de protéases de *B. cepacia* impliquées dans la virulence, tandis que les homosérines sécrétées par *B. cepacia* n'interagissent pas avec *P. aeruginosa* (Riedel *et al.* 2001).

#### *III-2.3.1.c. Dégradation des AI-1 par des bactéries*

Certaines espèces bactériennes sont capables de dégrader les auto-inducteurs de type 1 et pourraient donc éventuellement interférer dans les processus de maturation des biofilms. Dong *et al.* ont montré que plusieurs espèces appartenant au genre *Bacillus* : *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *B. mycoides* produisent une acyl-homosérine lactonase capable de couper le noyau lactone des AI-1 (Dong

et al. 2002). Clonée et exprimée chez des plantes, cette lactonase entraîne une résistance à l'infection par les pathogènes *Erwinia carotovora* et *Agrobacterium tumefaciens* (Molina et al. 2003) dont l'expression de la virulence est régulée par l'intermédiaire d'auto-inducteurs de type 1. Chez *A. tumefaciens*, les auto-inducteurs de type 1 servent notamment à réguler le passage vers un état de compétence pour un transfert conjugatif grâce à un appareil de sécrétion de type IV (plasmide Ti et ADN-T responsable de la formation de tumeurs chez la plante). Zhang et al. ont montré que *A. tumefaciens* produit aussi une acyl-homosérine lactonase qui permet de réguler la quantité d'AI-1 et donc le passage à l'état compétent (Zhang et al. 2002).

Lin et al. ont isolé à partir d'un biofilm polymicrobien prélevé dans un système expérimental de traitement des eaux usées une espèce : *Ralstonia* spp., capable de produire une acylase hydrolysant le groupement amide des acyl-homosérines lactones (Lin et al. 2003). Le clonage et l'expression du gène responsable de cette activité chez *P. aeruginosa* entraîne une répression de l'activité AI-1 et une diminution de l'expression d'un certain nombre de facteurs de virulence.

### III-2.3.2. Auto-inducteurs de type 2

#### III-2.3.2.a. Régulation du phénotype

Le rôle des auto-inducteurs de type 2 dans les processus de formation et de maturation des biofilms a essentiellement été étudié dans le cadre des biofilms formant la plaque dentaire. De nombreuses espèces isolées à partir de cet écosystème sont capables de sécréter des AI-2 (Fong et al. 2001). *Streptococcus mutans* est une espèce Gram positif cariogène qui possède un gène *luxS* codant pour un AI-2 important dans la formation du biofilm. Un mutant *luxS* – forme des structures granulaires dispersées plutôt qu'un biofilm d'aspect lisse et confluent observé chez la souche sauvage (Merritt et al. 2003).

Le cas de *Vibrio cholerae* est particulier car les deux systèmes AI-1 et AI-2 co-existent de la même façon que chez *V. harveyi*. Cette co-existence se traduit par l'existence de cascades de régulation faisant intervenir des complexes communs aux deux régulateurs. Le complexe LuxO joue un rôle charnière dans ce système.

Lorsque la densité cellulaire est faible il y a phosphorylation de LuxO qui en retour active un répresseur X (inconnu) qui réprime l'expression de *hapR* (homologue du *luxR* de *V. harveyi*), *V. cholerae* exprime alors un phénotype virulent et est à même de former des biofilms (Hammer *et al.* 2003). Inversement lorsque la densité cellulaire (donc la quantité d'autoinducteurs) est importante, les voies de signalisation entraînent une déphosphorylation de LuxO, *hapR* est alors activé et *V. cholerae* exprime un phénotype non virulent et incapable de former des biofilms, mais exprime en revanche une hémagglutinine protéase.

#### *III-2.3.2.b. Communication inter-espèces*

Le rôle des AI-2 a aussi été démontré dans la communication inter-espèces. Une étude récente menée par McNab *et al.* (2003) démontre que la présence d'un gène *luxS* fonctionnel chez *Streptococcus gordonii* est indispensable pour que cette bactérie puisse former des biofilms mixtes avec un mutant *luxS* – de l'espèce pathogène *Porphyromonas gingivalis* (McNab *et al.* 2003). L'espèce *Actinobacillus actinomycetemcomitans* possède aussi un gène *luxS*, codant pour un AI-2 capable de moduler l'expression de gènes sous la dépendance de *luxS* chez *P. gingivalis*.

# CHAPITRE II

## Matériels et Méthodes

## I- SUIVI DE LA COLONISATION D'UN RESEAU INTERIEUR PAR L. PNEUMOPHILA

Le but de cette première série de travaux est de comparer deux techniques de détection des légionelles dans les biofilms des réseaux de distribution d'eau potable : la FISH et la méthode AFNOR, et de réaliser un suivi de cette contamination pendant une période étendue afin d'essayer de mettre en relation les variations des quantités de légionelles avec les variations d'autres paramètres.

### I-1. MISE EN PLACE ET SUIVI DES INCUBATEURS A BIOFILMS

#### I-1.1. Construction des incubateurs

Les incubateurs, réalisés en PVC, comprennent 9 cartouches réparties sur 3 branches (Fig. 17). Des débitmètres permettent d'ajuster le débit dans chaque branche grâce à 3 vannes. Une vanne générale permet de couper la circulation de l'eau, et un compteur d'eau situé à la base du dispositif permet de mesurer la quantité totale d'eau écoulée à travers l'incubateur. Chaque cartouche mesure 14 cm de long, le diamètre intérieur est de 1,9 cm. Les cartouches sont remplies de 50 g de billes de verre borosilicaté de diamètre 5 mm (Promega) qui servent de support au développement du biofilm (surface totale : environ 190 cm<sup>2</sup>). Avant mise en place les billes sont nettoyées par immersion 12 h dans l'acide sulfochromique suivie d'un rinçage dans de l'eau distillée stérile, et stérilisées par autoclavage 20 min à 120°C.

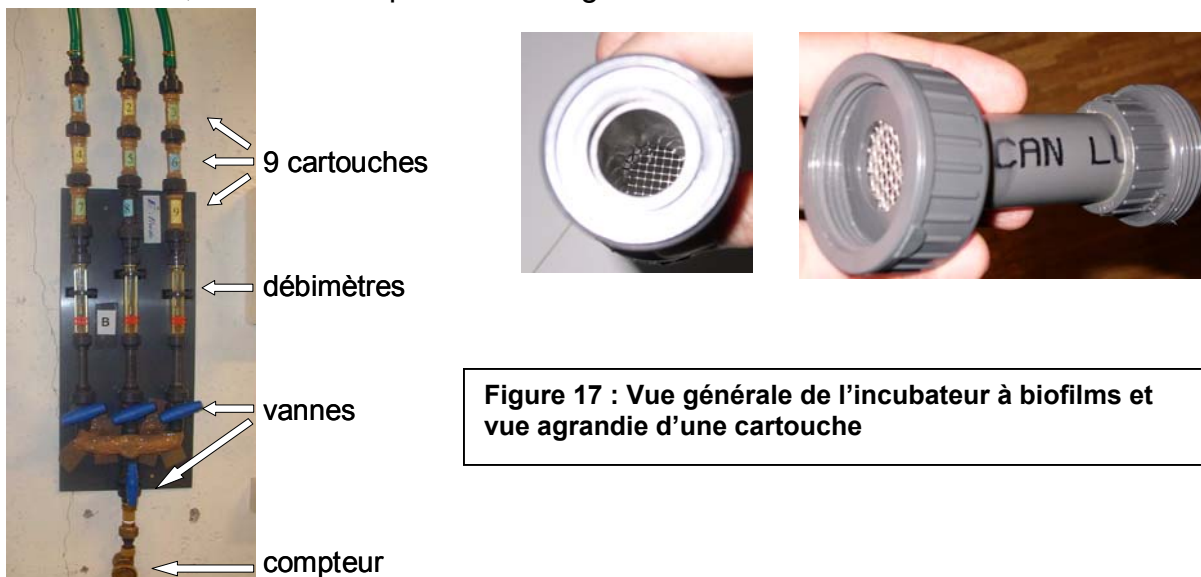


Figure 17 : Vue générale de l'incubateur à biofilms et vue agrandie d'une cartouche

## I-1.2. Mise en place des incubateurs

### I-1.2.1. Site choisi

Un réseau d'eau chaude sanitaire alimentant une piscine a été choisi pour implanter les deux incubateurs à biofilms. Il s'agit d'un circuit non bouclé présentant des mitigeurs sur tous les points de puisage. La distribution et le stockage de l'eau chaude à 60°C sont assurés par 8 ballons de 500 L équipés de serpentins chauffants. Il n'y avait pas d'adoucisseur sur l'eau froide d'appoint mais un système anti-tartre magnétique. Les incubateurs ont été installés après un mitigeur centralisé pour l'eau destinée aux pédiluves : un incubateur sur l'eau mitigée immédiatement en aval du mitigeur (Eau Chaude) et un incubateur sur l'eau froide (Eau Froide) en amont du mitigeur (Fig. 18). Les incubateurs ont été branchés en dérivation, en eau perdue avec rejet à l'égout.

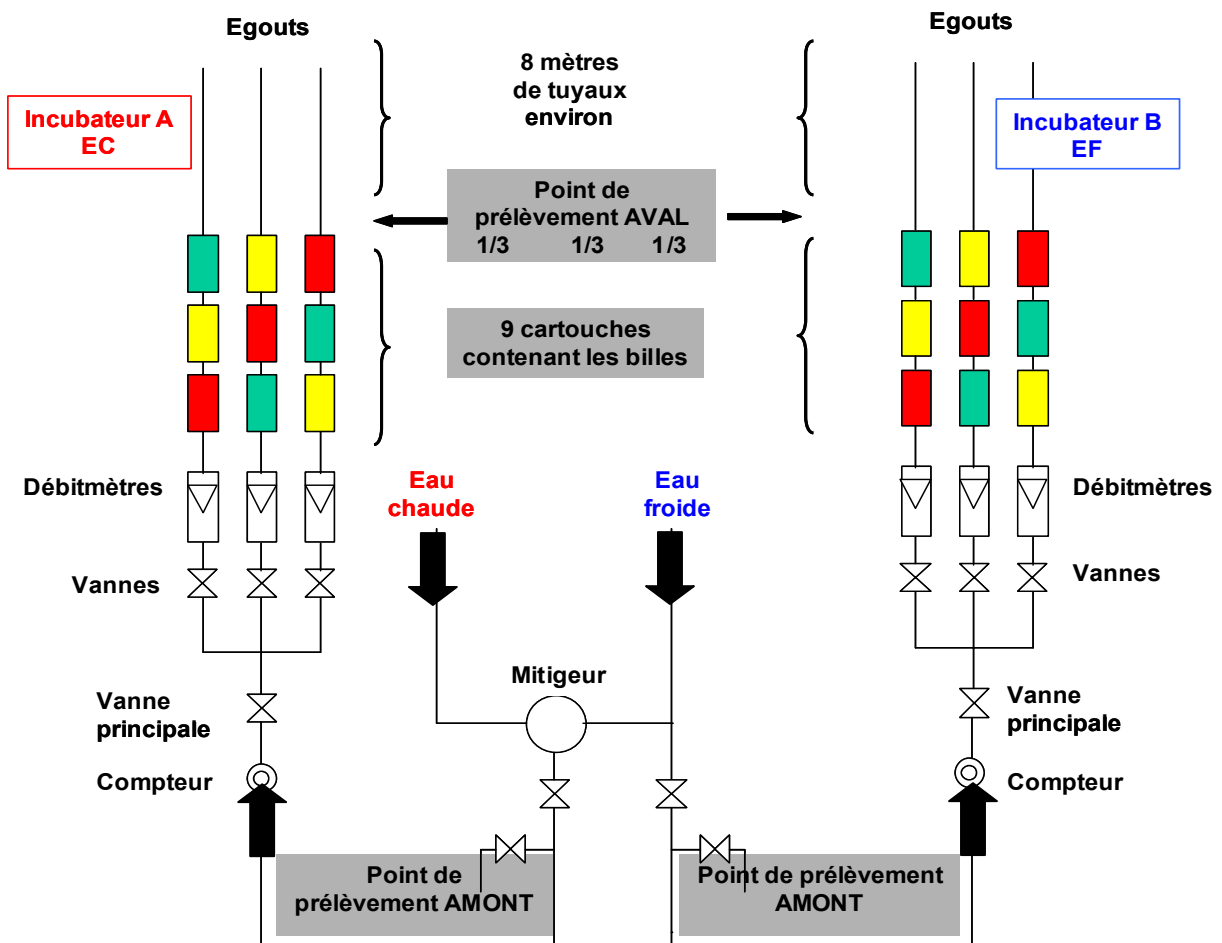


Figure 18 : Implantation des incubateurs dans le réseau d'eau chaude sanitaire. Les 3 diagonales correspondant à l'ordre de prélèvement des cartouches sont représentées en rouge, jaune et vert.

### I-1.2.2. Mise en eau des incubateurs et fréquence des prélèvements

Après installation, les incubateurs ont d'abord été alimentés en eau sans les billes pendant 2 semaines, avec un débit de circulation de 30 à 40 L/h afin de rincer abondamment le dispositif. Après cette période de rinçage les 9 cartouches ont été remplies avec les billes stériles. L'incubateur a ensuite été laissé en place pendant une période de colonisation de 1,5 mois, sans effectuer de prélèvements. L'étude s'est ensuite déroulée en deux phases : une phase de prélèvements rapprochés tous les 15 jours (durée : 3 mois de Juillet à Septembre), puis une phase de prélèvements espacés de 1 mois (durée : 8 mois de Octobre à Mai).

### I-1.2.3. Organisation des prélèvements et transport

Les prélèvements étaient réalisés à Lyon et acheminés à +4°C (transporteur : TSE Express Médical) jusqu'au lieu de l'analyse (UFR de Pharmacie, Châtenay-Malabry). Un délai maximum de 24 heures s'écoulait entre le prélèvement et l'analyse. A chaque prélèvement le contenu des 3 cartouches d'une même diagonale était récupéré pour analyse. Le renouvellement des billes d'une même diagonale avait donc lieu tous les mois et demi durant la première phase et tous les trois mois durant la deuxième phase.

## I-2. ANALYSES RÉALISÉES

### I-2.1. Détection des légionelles par culture

La détection des légionelles dans l'eau et dans les biofilms est effectuée selon la méthode AFNOR T90-431 (Annexe) : filtration, décrochage des bactéries de la membrane, sélection des légionelles par chauffage à  $50\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes, ensemencement sur gélose GVPC et incubation 10 j à  $37^\circ\text{C}$ .

Pour chaque incubateur (eau chaude et eau froide), les analyses suivantes sont réalisées :

- prélèvement de 1 L d'eau en amont de l'incubateur au niveau du tuyau alimentant le dispositif,
- prélèvement de 1 L d'eau en aval de l'incubateur, moyenné à partir de 3 prélèvements de 1/3 de L à la sortie de chaque branche,
- prélèvement des billes de la cartouche centrale, placées dans 50 mL d'eau du réseau stérilisée par filtration à 0,22  $\mu\text{m}$ . A l'arrivée au laboratoire les billes sont soniquées pendant 3 minutes et vortexées à vitesse maximale pendant 30 secondes. 100  $\mu\text{L}$  sont ensemencés directement sur gélose GVPC tandis que 2 x 10 mL sont soumis aux traitements de sélection acide et thermique avant ensemencement.

Pour chaque prélèvement positif sur gélose BCYE, 5 colonies sont traitées pour typage AP-PCR suivant la méthode décrite ci-dessous.

## **I-2.2. Typage des colonies isolées**

### **I-2.2.1. Souches utilisées pour la validation de la méthode de typage**

Afin de mettre au point la méthode de typage nous avons besoin d'une collection de souches de *L. pneumophila*. Celle-ci nous a été gracieusement fournie par le Centre National de Référence des Légionelles (P<sup>r</sup> J. Etienne, Lyon). Neuf souches environnementales de séro groupe 1 présentant chacune un pulsotype *sfil* différent en PFGE nous ont été adressées. Ces souches avaient été repiquées trois fois sur gélose. Elles sont nommées en fonction de leur origine : Lyon H2-II, Lyon H9-I, Lyon H9-II, Lyon L2-I, Nancy 12-I, Nancy 22-I, Paris 2-V, Paris 9-XXIV et Versailles 2-I.

Ces souches ont été acheminées en culture en gélose profonde. Dès réception elles ont été repiquées sur gélose BCYE (Oxoid, France) et cultivées 10 jours à 37°C en atmosphère humide, après lesquels un stock d'une dizaine d'aliquotes par souche a été réalisé. Pour chaque aliquote une colonie était reprise dans du bouillon de culture BCYE sans charbon actif (Annexe I) additionné de 20% de glycérol et congelée à -80°C en cryotube. Parallèlement, nous avons effectué un test au latex (Oxoid, France) afin de vérifier l'existence d'une agglutination en présence d'anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques du séro groupe 1.



### I-2.2.2. Extraction de l'ADN et typage

L'extraction de l'ADN est effectuée à partir des colonies issues du premier repiquage avec le kit "AquaPure Genomic DNA Isolation Kit" (Bio-Rad, référence : 732-6340). En fin d'extraction la pureté et la concentration de l'ADN sont évaluées par lecture de l'absorbance à 260 et à 280 nm d'une dilution au 1/100 de l'extrait. Les ADN sont dilués en eau millipore stérile afin d'atteindre une concentration de 50 ng/μL, puis ils sont stockés au congélateur à -20°C.

Le typage des souches est réalisé en utilisant la méthode d'AP-PCR décrite par Lawrence *et al.* (1999). Pour chaque échantillon, trois réactions d'hybridation / amplification sont réalisées avec trois amorces différentes afin d'obtenir un pouvoir discriminant satisfaisant.

Les séquences des amorces sont présentées ci-dessous (Eurobio, Les Ulis, France) :

Amorce B1245 :	5'-AGGTGGCGTTCGAGGAAGAC-3'
Amorce IR6110 :	5'-CCCGGCATGTCCGGAGACTC-3'
Amorce LEG-2 :	5'-CTGGCTTCTTCCAGCTTCA-3'

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 20 μL :

- tampon PCR 10X (Sigma) : 2 μL
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Sigma) : 1,6 μL
- amorce 1 μM : 2 μL
- Taq polymérase 0,5 U / μL (Sigma) : 1 μL
- dNTPs (Sigma) 2 mM : 2 μL de chaque
- ADN 50 ng/μL : 1 μL
- Eau MilliQ stérile : qsp 20 μL

La réaction d'amplification est effectuée dans un thermocycleur PCR Express (Hybaid, France) et comprend :

- une étape d'activation de la Taq polymérase : 5 minutes à 94°C
- 36 cycles d'amplification comprenant chacun :

- 1 minute à 92°C pour la dénaturation
- 1 minute à 35°C pour l'hybridation des amorces
- 2 minutes à 72°C pour l'élongation
- une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 7 minutes

8 µL de produits de PCR sont additionnés de 2 µL de Stop-Mix 5X (glycérol 25%, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,05%, xylène cyanolique 0,05%). Les produits d'amplification sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% + BET (migration 3 à 4 heures à 80 mV). L'observation et la photographie des gels est effectuée sur table UV (appareil photo numérique Kodakman DC120 & logiciel Kodak 1DLE)

### **I-2.3. Détection des légionelles et de la flore totale dans les biofilms par méthode FISH**

#### I-2.3.1. Fixation des échantillons

Le reste de la suspension de biofilm utilisée pour le dénombrement (env. 25 mL) est filtré sur membrane de polycarbonate 0,22 µm et fixé par immersion 3 h à +4°C en PFA 4%. Par ailleurs, pour chaque diagonale prélevée le contenu des deux cartouches extérieures est réparti en deux moitiés traitées différemment :

- Une moitié des billes est placée dans 50 mL d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (Annexe II) pour fixation pendant le transport à +4°C,
- L'autre moitié est reprise dans 45 mL d'eau du réseau stérilisée par filtration à 0,22 µm, à laquelle sont ajoutés 0,5 mL d'une solution stérile d'acide pipémidique à 3 mg/mL dans de la soude 0,05 M (concentration finale : 30 µg/mL). A l'arrivée au laboratoire 5 mL de bouillon R2A 10X (Annexe I) sont ajoutés et les billes sont incubées à l'obscurité pendant 16 h à 20°C. Elles sont ensuite soniquées pendant 3 minutes et vortexées à vitesse maximale pendant 30 secondes, puis la suspension obtenue est filtrée sur membrane de polycarbonate 0,22 µm (Millipore). La membrane est fixée par immersion 3 h à +4°C en PFA 4%.

Les billes sont ensuite soniquées pendant 3 minutes et vortexées à vitesse maximale pendant 30 secondes, puis la suspension obtenue est filtrée sur

membrane de polycarbonate 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Les cellules sont rincées par filtration de 3 x 10 mL d'eau MilliQ stérile, puis la membrane est placée dans 5 mL d'une solution d'éthanol / PBS 1:1 (v/v) (EtOH/PBS) filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ , et conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse.

#### I-2.3.2. Hybridation et observation

Le protocole d'hybridation est décrit en annexe II. Pour hybrider ces échantillons nous avons utilisé la sonde universelle EUB338 pour révéler la flore totale (hybridation avec toutes les bactéries) et la sonde LEGPNE1 pour détecter *L. pneumophila*, la sonde Non338 servant de témoin négatif (Tab. IX). Ces sondes ont d'abord été validées suivant un protocole mis au point lors d'études antérieures décrites dans l'article présenté en Annexe V (Thomas *et al.* 2002). Cette méthode repose sur l'utilisation de sondes marquées au FITC, couplées à un contre-marquage à l'iodure de propidium et à une détection en cytométrie de flux. Le principe de cette détection repose sur une présélection des cellules marquées par l'intercalant de l'ADN (IP), ce n'est ensuite qu'au sein de ce groupe que sont comptés les événements marqués par la sonde. Cette méthode permet donc d'éliminer de l'analyse les particules ne contenant pas d'ADN et de compter un nombre très important de cellules, donc d'obtenir des résultats statistiquement pertinents. Nous l'avons appliquée sur une culture pure de la souche isolée dans le réseau, fixée en PFA après 72 h de croissance en bouillon BCYE à  $37^{\circ}\text{C}$  (phase exponentielle). Pour l'analyse des biofilms, les sondes sont marquées en Cy3, un contre-marquage au syto-9 (Molecular Probes) est réalisé après hybridation. L'observation est faite à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence Nikon TE200 équipé des blocs filtres B-2A (syto-9) et G-2A (Cy3) et d'une caméra Nikon DXM 1200.

#### I-2.4. Paramètres physico-chimiques relevés

Les paramètres physico-chimiques suivants ont été mesurés à chaque échantillonnage : température de l'eau, pH, conductivité, potentiel redox, oxygène dissous, chlore libre et chlore total. Ces mesures ont été réalisées par Nathalie ROUSSEL (Cylergie, Lyon) à l'aide de kits colorimétriques et de sondes multi-paramètres

### I-3. ESSAIS DE REALISATION DE BIOFILMS MIXTES : *L. PNEUMOPHILA* ISSUE DU RESEAU / ESPECES PARTICULIERES

Une potentialisation de la croissance de *L. pneumophila* par d'autres espèces bactériennes a été rapportée dans la littérature : *Empedobacter brevis* (ancienne dénomination : *Flavobacterium breve*) et *Brevundimonas vesicularis* (ancienne dénomination : *Pseudomonas vesicularis*) permettent la croissance satellitaire des légionelles sur gélose BCYE sans cystéine. Dans l'expérience décrite ci-dessous nous avons voulu déterminer la capacité de *L. pneumophila* à coloniser et à se multiplier dans des biofilms constitués de ces espèces.

#### I-3.1. Préparation des supports de biofilms

Des coupons découpés dans une plaque de silicone d'épaisseur 1 mm (Promega) ont été utilisés comme support de la formation des biofilms. Ces coupons d'approximativement 0,5 x 2 cm sont insérés dans des bouchons de silicone poreux préalablement fendus et insérés dans le capuchon d'un flacon normalement utilisé pour des prélèvements automatiques à travers une capsule de silicone (Fig. 19). L'agitation du milieu est assurée par un micro-barreau magnétique à revêtement Téflon, de dimensions 5 x 3 mm.

Avant utilisation tout le matériel est lavé suivant la procédure décrite par Briandet *et al.* (1999) : agitation pendant 10 min dans une solution à 3% de RBS 35 (Société de Traitement Chimique des Surfaces, Lambersart, France) dans de l'eau MilliQ à 50°C, 1 rinçage de 10 min avec de l'eau MilliQ à 50°C et 5 rinçages successifs avec de l'eau MilliQ à température ambiante. Le matériel est ensuite séché au four à 120°C pendant 2 heures, puis autoclavé pendant 20 min à 120°C.



Figure 19 : coupon de silicone monté sur le bouchon silicone poreux lui-même inséré dans le capuchon d'un flacon pour prélèvement automatique

### I-3.2. Préparation des biofilms

Les 3 espèces : *B. vesicularis* ATCC11426, *E. brevis* ATCC 43319 et *P. aeruginosa* CIP A22 sont ensemencées sur gélose LB (Annexe I). Après 48 h de croissance à 25°C (*B. vesicularis*) ou à 30°C (*E. brevis* et *P. aeruginosa*), des colonies sont prélevées et diluées dans de l'eau du robinet stérilisée par autoclavage pour atteindre une DO<sub>600</sub> de 0,5 (concentration approximative :  $5 \cdot 10^8$  cellules / mL). Cette suspension est ensuite diluée au 1/10 dans la même eau et 150 µL sont introduits dans les flacons contenant 15 mL du milieu de culture des biofilms décrit par Murga *et al.* (2001). La composition par litre de milieu est la suivante : 0,05 g d'extrait de levure, de proteose peptone n°3, d'acides casaminés et de dextrose, 0,03 g de pyruvate de sodium et de phosphate de potassium dibasique, et 0,005 g de phosphate de magnésium. Quatre types d'ensemencements sont réalisés : les trois espèces séparément et un témoin sans ensemencement.

Les flacons sont ensuite incubés sous agitation lente pendant 48 h, à 25°C pour *B. vesicularis*, à 30°C pour les autres. Puis le milieu est remplacé par du milieu dilué au 1/10 et les flacons sont réincubés 48 h dans les mêmes conditions. Le milieu de culture est ensuite remplacé par de l'eau prélevée sur le réseau sur lequel sont implantés les incubateurs à billes de verre. L'eau a été prélevée en amont de l'incubateur eau chaude, avec ajout de 250 mg/L de pyrophosphate de fer puis filtration à 0,22 µm.

### I-3.3. Injection de *L. pneumophila* et déroulement de l'étude

Après 48 h d'incubation, toujours dans les mêmes conditions, l'eau additionnée de fer est renouvelée, et 150 µL d'une suspension de la souche de *L. pneumophila* préalablement isolée dans le réseau sont introduits. La souche a préalablement été cultivée 5 jours à 37°C sur gélose BCYE et diluée dans les mêmes conditions que les autres espèces. Les flacons sont incubés à 30°C sous agitation lente et le milieu est renouvelé de 20% tous les jours. Des flacons sont prélevés pour analyse à J2, J7, J14 et J21 après introduction de *L. pneumophila*.

### I-3.4. Analyses effectuées

#### I-3.4.1. Dénombrements

##### I-3.4.1.a. Phase planctonique

Après retrait du coupon 2 x 100 µL de suspension sontensemencés directement sur géloses R2A et GVPC. 2 x 1 mL sont prélevés pour dilution et ensemencement sur R2A, et 2 x 2 mL pour traitement de sélection thermique avant dilution et ensemencement sur gélose GVPC. Le dénombrement de *P. aeruginosa* et de *E. brevis* est réalisé après 24 à 48 h d'incubation sur gélose R2A à 30°C, celui de *B. vesicularis* après 5 j d'incubation sur R2A à 25°C et celui de *L. pneumophila* après 5 à 7 j sur GVPC à 37°C..

##### I-3.4.1.b. Biofilm

La partie inférieure du coupon de silicone (env. 1 cm de longueur) est coupée stérilement. La partie ainsi détachée est destinée au dénombrement : elle est reprise dans 2 mL d'eau de réseau stérile, soniquée 3 min et vortexée 30 sec. Les légionelles et les autres espèces sont ensuite dénombrées de la même façon que pour la phase planctonique.

#### I-3.4.2. Observation microscopique des biofilms

La partie supérieure, toujours insérée dans le bouchon poreux, est immergée pendant 3 h dans du PFA 4% à +4°C , rincée par immersion 3 min dans de l'eau MilliQ stérile et stockée dans une solution EtOH/PBS à -20°C. L'hybridation est réalisée directement sur le coupon par dépôt de la solution d'hybridation, incubation 90 min à 46°C en chambre humide, immersion 10 min dans le tampon de lavage à 48°C, contre-marquage par immersion 3 min dans une solution de syto-9 glacée et montage en SlowFade Antifade (Molecular Probes). Seule la sonde LEG705 marquée en Cy5 a été utilisée sur les biofilms polymicrobiens. Sur les biofilms constitués de *L. pneumophila* seule nous avons aussi utilisé la sonde EUB338 marquée en Cy5. L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM510, les réglages utilisés sont les mêmes que ceux décrits ci-dessous pour l'observation des biofilms hybridés.

## **II- COMPARAISON DE L'EFFICACITE DES TRAITEMENTS DE DESINFECTION VIS-A-VIS D'UN RESEAU INTERIEUR COLONISE PAR *L. PNEUMOPHILA***

Un grand nombre de traitements sont aujourd'hui disponibles pour empêcher la prolifération des micro-organismes dans les réseaux d'eau potable. La plupart des études portant sur l'efficacité de ces traitements se limitent à l'évaluation d'une seule méthode, et la variabilité des paramètres physico-chimiques rend difficile les comparaisons inter-études. Dans cette deuxième partie expérimentale nous utilisons un pilote mis au point par l'équipe du CIRSEE afin de pouvoir tester et comparer dans des conditions identiques les traitements de désinfection couramment utilisés pour l'eau potable.

### **II-1. TESTS D'INOCULATION DE *L. PNEUMOPHILA***

Afin de s'assurer de la faisabilité de la création d'un écosystème colonisé par *L. pneumophila* sur le pilote, des tests ont d'abord été réalisés sur une petite unité "prépilote".

#### **II-1.1. Construction et colonisation de l'unité prépilote**

Elle consiste en une boucle en acier galvanisé de diamètres intérieur et extérieur 26/34 mm et d'une longueur de 3 m. La boucle baigne dans un bain-marie dont la température est maintenue à 35 °C. Le débit de circulation est maintenu à 200 L/h grâce à une pompe, le volume total circulant est de 2,2 L.

La colonisation de la boucle a été effectuée par circulation à un débit de 6 L/h pendant 3 jours d'eau de Seine filtrée sur sable. Une dilution progressive a ensuite été réalisée en remplaçant quotidiennement 20% du volume circulant total par de l'eau du robinet. Ce taux de renouvellement a ensuite été gardé constant pendant l'étude.

## **II-1.2. Tests d'inoculation de *L. pneumophila***

### **II-1.2.1. Analyses avant inoculation**

L'unité prépilote a d'abord fonctionné pendant 2 mois avant inoculation d'un mélange de souches de *L. pneumophila*. Durant ces deux premiers mois deux dénombrements ont été réalisés dans l'eau circulant dans la boucle, permettant d'isoler une souche séroroupe 2-14. Celle-ci a été réutilisée pour le test d'inoculation du mélange de souches.

### **II-1.2.2. Inoculation**

Afin d'évaluer la capacité de la première souche à persister malgré un apport massif d'autres souches, un mélange de 5 souches a été inoculé au 75<sup>ème</sup> jour. Une suspension de 10 mL de PBS stérile a été préparée par mélange de 5x2mL des suspensions ajustées à une  $DO_{600} = 1$  des souches suivantes : la souche séroroupe 2-14 isolée initialement dans le prépilote, 3 souches séroroupe 1 isolées et typées lors d'analyses réalisées dans des réseaux domestiques et des tours aéro-réfrigérantes en région parisienne, et enfin la souche séroroupe 1 "Paris" qui nous a été fournie par le Centre de Référence.

Un jour après l'inoculation et ensuite toutes les semaines pendant 1 mois, 1 L d'eau a été collecté à la sortie de l'incubateur, les légionelles ont été détectées en utilisant la méthode AFNOR et pour chaque prélèvement 20 colonies ont été typées grâce à la méthode décrite ci-dessus.

## **II-2. CONSTRUCTION ET COLONISATION DU PILOTE**

### **II-2.1. Présentation du pilote**

#### **II-2.1.1. Schéma général**

Le pilote est constitué de 7 circuits identiques simulant le réseau de distribution intérieur d'un bâtiment de cinq étages, et comprenant chacun deux parties distinctes (Fig. 20 et 21) :



- une boucle de recirculation en acier galvanisé longue de 30 m, de diamètre intérieur/extérieur 26/34 mm et d'un volume total de 16 L, dans laquelle la vitesse de circulation est de 10 cm/sec (200 l/h),
- un bras mort en cuivre long de 13 m, de diamètre intérieur/extérieur : 20/22 mm et d'un volume total de 4 L.

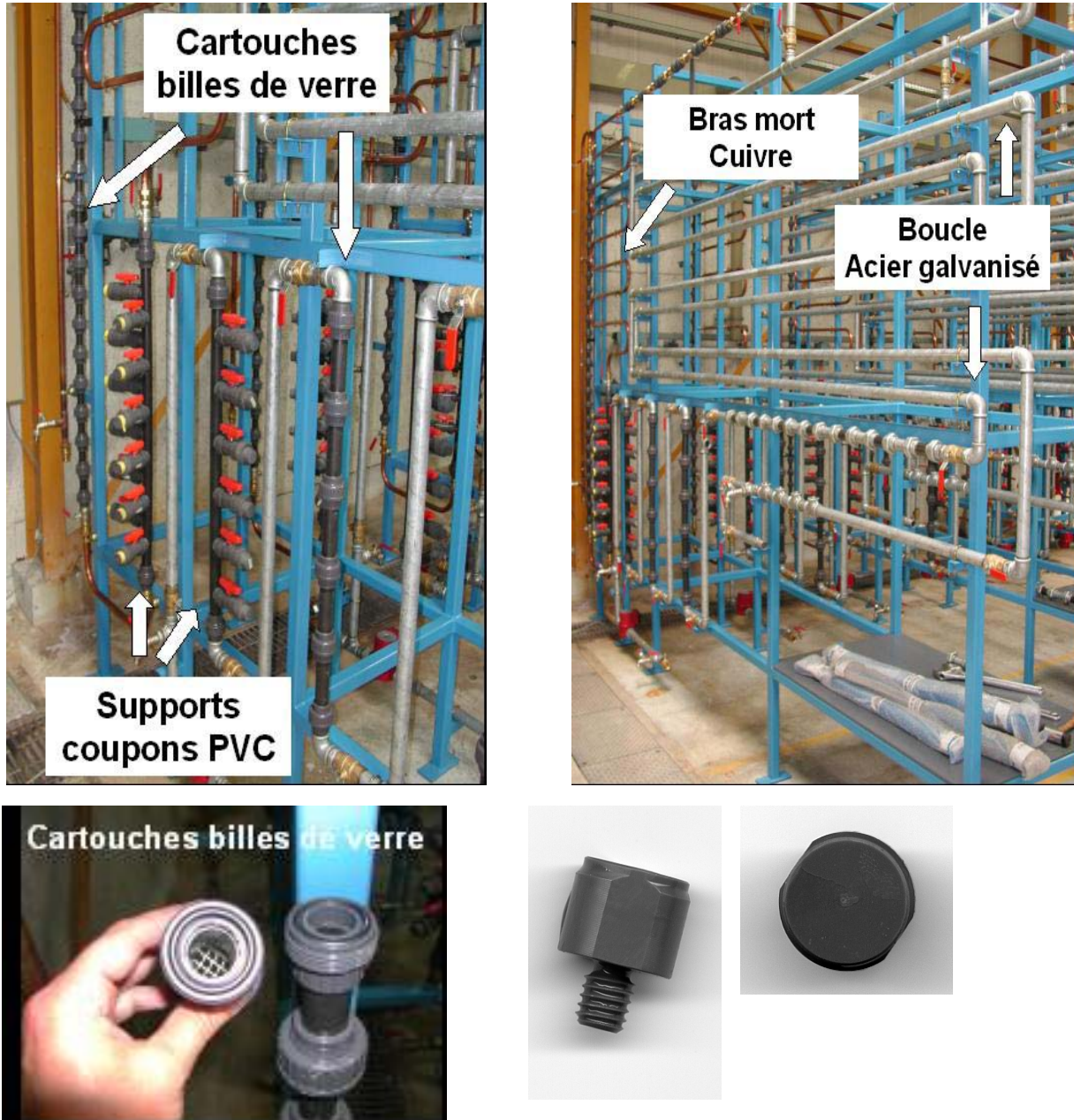


Figure 20 : photographies du pilote. En haut à droite : vue d'ensemble d'une unité boucle + bras mort. En haut à gauche : systèmes de prélèvements des biofilms sur billes de verre et sur coupons PVC utilisés dans les 2 types de canalisations. En bas à gauche : détail des cartouches de billes de verre, à droite : détail des coupons PVC.



Le système est alimenté avec de l'eau potable filtrée sur charbon actif pour éliminer tout résiduel de chlore. La pression est limitée à 2 bars. La régulation de la température est assurée par un ballon d'eau chaude situé sur la canalisation alimentant le pilote et par des câbles chauffants enroulés autour de la boucle en acier et du bras mort en cuivre. Une fois les câbles chauffants installés les canalisations ont été recouvertes par une gaine d'isolation thermique. La température de l'eau a été maintenue à 35°C pendant toute la durée de l'étude.

#### II-2.1.2. Prélèvements

Des robinets permettent de prélever de l'eau en différents points du système. Pour l'analyse des biofilms deux types de systèmes de prélèvements sont installés :

- des cartouches en PVC remplies de billes de verre borosilicaté de diamètre 5 mm (Promega) pour les analyses quantitatives. 8 compartiments contenant chacun 700 billes de verre (surface totale : 550 cm<sup>2</sup>) sont installés en ligne sur la boucle en acier galvanisé, 23 compartiments contenant chacun 200 billes (surface totale : 157 cm<sup>2</sup>) sont installés en ligne sur les bras morts.
- 6 coupons en PVC de surface 2 cm<sup>2</sup> (Fig. 20) insérés dans chaque boucle de recirculation, et 12 dans chaque bras mort. Une valve permet de prélever les coupons sans interrompre le flux dans les canalisations.

#### II-2.1.3. Mesures de sécurité

Un certain nombre de mesures de sécurité ont été prises afin de limiter les risques de dissémination des micro-organismes présents dans le pilote : limitation de la pression interne à 2 bars, installation de revêtement isolants autour des canalisations, filtration des rejets des pièges à bulles d'air, confinement de l'unité pilote sous une bâche isolante et dépressurisation, filtration de l'air extrait de l'unité de confinement, limitation de l'accès au personnel autorisé avec port de masques respiratoires obligatoire, désinfection des effluents avant rejet à l'égout.

## II-2.2. Colonisation du pilote

Chaque circuit a été rempli avec de l'eau de rivière (Seine) filtrée sur sable introduite par la vanne n°8. Cette eau a circulé pendant 5 jours dans les boucles, puis elle a été renouvelée de 15 L par jour pendant 7 jours avec rejet de l'excès à travers le bras mort en cuivre. Au 13<sup>ème</sup> jour une dilution quotidienne de 25% avec de l'eau potable du réseau filtrée sur charbon actif a été instaurée. Ce taux de renouvellement a été appliqué pendant 4 semaines, l'eau en excès était rejetée à travers le bras mort.

Après ces 4 semaines, une recherche de légionelles a été menée (norme AFNOR) pour s'assurer de la colonisation suffisante du système par *L. pneumophila*. Une souche naturellement présente dans l'eau et/ou les biofilms de 4 canalisations a été isolée et typée. A la dixième semaine elle a été cultivée sur gélose BCYE et 1 mL d'une suspension de  $DO_{600} = 1$ , soit environ  $10^9$  UFC, a été réinjecté dans chacun des 7 circuits.

Une période de stabilisation du système a ensuite été observée : pendant 3 mois, la totalité du contenu des boucles de recirculation a été renouvelé quotidiennement avec de l'eau de réseau tandis que l'eau des bras morts n'était renouvelée que de 20% / j avec de l'eau provenant des boucles de recirculation.

## II-3. ESSAIS DE DESINFECTION

Les traitements ont été testés en continu pendant 3 mois, sauf la monochloramine qui a été interrompue après 1 mois à cause des difficultés rencontrées dans la génération du produit. Pendant les 2 premiers mois les taux de renouvellement de l'eau dans les canalisations sont restés les mêmes que durant la phase de colonisation. Le dernier mois, l'eau des bras morts en cuivre était entièrement renouvelée 4 fois par jour avec l'eau provenant des boucles, simulant ainsi un réseau intérieur de distribution hautement sollicité. Par voie de conséquence, l'eau des boucles était diluée au  $\frac{1}{4}$  par de l'eau du réseau 4 fois par jour.

Tous les traitements à base de chlore sont injectés en continu à partir d'une solution stock préparée à l'avance, la concentration étant suivie par dosage

ampérométrie grâce à une sonde installée en dérivation. Le traitement au cuivre/argent est généré en ligne et l'ozone est produit et injecté dans la boucle en continu. Un circuit non traité sert de témoin.

### **II-3.1. Chlore**

Le traitement est préparé par dilution d'une solution d'hypochlorite de sodium à 5% à une concentration de 500 mg/L. Avant dilution, la concentration exacte de la solution à 5% est déterminée par la méthode spectrophotométrique ISO 7393-2 et le facteur de dilution est adapté en conséquence. Cinq litres correspondant à 4 ou 5 jours de traitement sont préparés à chaque fois. Concentration cible dans la boucle : 2,5 mg/L équivalent chlore libre.

### **II-3.2. Electro-chloration**

Un système transportable MIOX BPS (société MIOX) capable de produire une concentration en chlore libre de 600 mg/L est utilisé. Il est alimenté par une solution à 15 g/L de chlorure de sodium et utilisé de manière discontinue pour produire 5 litres de solution correspondant à 4 ou 5 jours de traitement. A chaque utilisation, seul le flux provenant de l'anode est collecté après stabilisation de l'ampérage entre 10 et 12 ampères. La concentration finale en chlore est déterminée par la méthode spectrophotométrique ISO 7393-2. Concentration cible dans la boucle : 2,5 mg/L équivalent chlore libre.

### **II-3.3. Dioxyde de chlore**

Un système Envirox 1000 (société Nalco) générant une solution à 500 mg/L de dioxyde de chlore est utilisé. Il est alimenté par de l'eau Millipore (générée par un système Milli RX-20) et par une solution à 5% de chlorite de sodium (Envirox PWT) et est aussi utilisé de manière discontinue pour produire 5 litres de solution correspondant à 4 ou 5 jours de traitement. La solution stock est protégée de la lumière. A chaque utilisation seul le flux provenant de l'anode est collecté après stabilisation de la concentration en dioxyde de chlore mesurée par spectrophotométrie à 445 nm (méthode Hach DR/2000 n°8138). Concentration cible dans la boucle : 0,5 mg/L .

### **II-3.4. Monochloramine**

La solution est préparée par mélange de 1 mL d'ammoniaque avec 100 mL d'eau ultrapure, ajout de 10 mL d'une solution à 15% d'hypochlorite de sodium et ajustement immédiat du pH entre 7,0 et 8,0 à l'aide d'une solution d'HCl 1M. La concentration finale est déterminée par la méthode spectrophotométrique ISO 7393-2. Cette méthode de synthèse permet l'obtention d'une solution de monochloramine à une concentration de 400 à 500 mg/L (équivalent chlore). Cependant, la solution obtenue est instable, elle a donc été renouvelée deux fois par jour durant l'étude (excepté les week-ends). Concentration cible dans la boucle : 2 mg/L.

### **II-3.5. Cuivre-Argent**

Le traitement est assuré par un système Sanichem LP2-5 (société Sanichem) utilisable pour traiter des débits allant jusqu'à 70 m<sup>3</sup>/h. Ce système comprend une chambre d'ionisation contenant deux électrodes en alliage cuivre/argent, et un système de régulation de l'intensité délivrée aux électrodes. La polarité des électrodes est automatiquement inversée de façon régulière pour assurer une ionisation homogène des deux électrodes. La chambre est placée en dérivation de la boucle principale, les concentrations ciblées sont de 0,5 mg/L pour le cuivre et 0,01 mg/L pour l'argent. Le résiduel de cuivre est dosé par méthode électrochimique (analyseur Palintest SA-1000). La concentration résiduelle en argent n'est pas suivie puisqu'elle est supposée proportionnelle à la concentration de cuivre.

### **II-3.6. Ozone**

Un générateur d'ozone Ozonia TOGC2 (Ozonia) capable de produire 10 g d'ozone par heure est utilisé. Le générateur est alimenté avec de l'oxygène et produit 4 g d'ozone par m<sup>3</sup> dans le flux d'oxygène. La production d'ozone est suivie en continu grâce à un appareil de dosage en ligne BMT 961, et l'ozone est injecté à travers un éducteur dans une colonne de contact de volume 16 L (diamètre : 10 cm, hauteur : 2 m) connectés en série sur la boucle. Un débitmètre permet l'ajustement du flux d'oxygène ozoné afin d'obtenir un ratio de 0,5 mg d'ozone par litre d'eau à l'entrée de la colonne de contact.

## II-4. ESSAIS DE RECOLONISATION

Trois mois et demi (J106) après le début des traitements des tests de recolonisation des circuits ont été réalisés. Une membrane d'ultrafiltration Aquasource M1-A35 a été installée à l'entrée du pilote pour éviter toute contamination extérieure par des légionelles qui pourraient être transportées par l'eau alimentant le pilote, et les traitements ont été interrompus afin d'observer une éventuelle recolonisation par *L. pneumophila*.

## II-5. METHODES D'ANALYSE

### II-5.1. Analyses par culture

Les méthodes classiques de culture des micro-organismes ont été utilisées pour le suivi de la contamination de l'eau et du biofilm pendant toute la durée de l'étude. Le décrochage du biofilm des billes de verre est réalisé par sonication pendant 3 min des billes transférées dans de l'eau du réseau stérilisée par filtration (60 mL d'eau pour 200 billes environ).

*L. pneumophila* est dénombrée selon la norme AFNOR T90-431 (Annexe III). La flore totale est dénombrée sur gélose R2A après incubation 7 j à 22°C. Les amibes sont isolées sur tapis cellulaire d'*E. coli* vivants déposés sur gélose non nutritive (Annexe III). Elles sont dénombrées en utilisant la méthode du nombre le plus probable (Annexe III).

### II-5.2. Analyses après marquage fluorescent

#### II-5.2.1. Marquage de viabilité des biofilms

Une évaluation de la quantité de biomasse présente dans les biofilms et des proportions de bactéries vivante / morte dans cette biomasse a été réalisée par marquage des biofilms avec le réactif *BacLight*<sup>®</sup> LIVE/DEAD de Molecular Probes (ref L-13152). Le principe de ce marquage repose sur une différence de capacité de deux marqueurs à pénétrer dans les bactéries : le syto-9 diffuse librement à travers la paroi des bactéries vivantes ou mortes, tandis que l'iodure de propidium (IP) ne diffuse qu'à

travers la paroi altérée des bactéries mortes. Ces deux marqueurs se lient à l'ADN et l'iodure de propidium déplace le syto-9 : il en résulte donc une coloration verte des bactéries vivantes, rouge des bactéries mortes.

Des coupons de PVC ont été prélevés dans les boucles en acier galvanisé 12 jours avant le début des traitements puis 6, 35 et 106 jours après. Des coupons ont été prélevés dans les bras morts en cuivre 12 jours avant le début des traitements puis 51 et 106 jours après. Ces coupons sont prélevés le matin, transportés au laboratoire dans de l'eau de réseau filtrée, marqués et analysés l'après-midi. Le marquage LIVE/DEAD est réalisé suivant les recommandations du fabricant : reprise des pipettes de réactifs dans 10 mL d'eau MilliQ stérile, et incubation des coupons 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Les coupons sont ensuite rincés brièvement dans de l'eau MilliQ stérile et observés immédiatement.

#### II-5.2.2. Marquage des groupes bactériens des biofilms

Le principe de ce type de marquage a déjà été évoqué dans le chapitre bibliographique (paragraphe I-2.1.2.b.).

Nous avons utilisé un panel de sondes dirigées contre l'ARN ribosomal de certains groupes bactériens afin d'évaluer la composition de la flore des biofilms (Tab. IX). Ces sondes sont classiquement utilisées dans l'étude des populations des biofilms dans l'eau potable et couvrent la majorité des groupes rencontrés. Les sondes utilisées dans cette étude sont marquées en 5' par le fluorochrome Cy5 (Q-BIOgène, Evry, France).

**Tableau IX : Liste des sondes utilisées**

Sonde	Spécificité	Molécule d'ARNr ciblée et site (positions <i>E. coli</i> )	Séquence de la sonde (5'-3')	% formamide dans le tampon d'hybridation	Ref
EUB338	Domaine <i>Bacteria</i>	16S (338-355)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	(Amann <i>et al.</i> 1990a)
EUB338 II	<i>Planctomycetales</i>	16S (338-355)	GCAGCCACCCGTAGGTGT	20	(Daims <i>et al.</i> 1999)
EUB338 III	<i>Verrucomicrobiales</i>	16S (338-355)	GCTGCCACCCGTAGGTGT	20	(Daims <i>et al.</i> 1999)
Non338	Contrôle Négatif		ACATCCTACGGGAGGC	20	(Manz <i>et al.</i> 1992)
ALF968	La plupart des $\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	16S (968-985)	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	35	(Neef 1997)
BET42a	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	23S (1027-1043)	GCCTTCCCACCTCGTTT	35	(Manz <i>et al.</i> 1992)
GAM42a	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	23S (1027-1043)	GCCTTCCCACATCGTTT	35	(Manz <i>et al.</i> 1992)
SRB385	SRB des $\delta$ - <i>Proteobacteria</i> (essentiellement <i>Desulfovibrionaceae</i> ) et quelques gram-positif	16S (385-402)	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	35	(Amann <i>et al.</i> 1990b)



Tableau IX suite

Sonde	Spécificité	Molécule d'ARNr ciblée et site (positions <i>E. coli</i> )	Séquence de la sonde (5'-3')	% formamide dans le tampon d'hybridation	Ref
CF319a	Cytobacter-Flavobacter	16S (319-336)	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	(Manz <i>et al.</i> 1996)
LEGPNE1	<i>Legionella pneumophila</i>	16S (621-638)	ATCTGACCGTCCCAGGTT	25	(Grimm <i>et al.</i> 1998)
LEG705	<i>Legionella</i>	16S (705-722)	CTGGTGTTCCTCCGATC	20	(Manz <i>et al.</i> 1995)
HGC69a	Gram-positifs à haut GC	23S (1901-1918)	TATAGTTACCACCGCCGT	20	(Roller <i>et al.</i> 1994)
NHGC	Compétiteur utilisé avec HGC69a	23S (1901-1918)	TATAGTTACGGCCGCCGT	20	(Roller <i>et al.</i> 1994)
LGC354Ae	Gram-positifs à faible GC	16S (354-371)	TGGAAGATTCCTACTGC	35	(Meier <i>et al.</i> 1999)
LGC354Be	Gram-positifs à faible GC	16S (354-371)	CGGAAGATTCCTACTGC	35	(Meier <i>et al.</i> 1999)
LGC354Ce	Gram-positifs à faible GC	16S (354-371)	CCGAAGATTCCTACTGC	35	(Meier <i>et al.</i> 1999)

A J6 après traitement pour les boucles et à J51 pour les bras morts, des billes de verres ont été prélevées et fixées par immersion dans 50 mL de PFA 4% pendant 3 h à +4°C. Les biofilms sont ensuite traités et hybridés de la même façon que décrit ci-dessus pour les incubateurs en réseau. Le témoin positif est constitué par une hybridation avec un mélange en quantités égales des trois sondes EUB338 I, II et III (MixEUB338). La sonde Bet42a est hybridée en présence d'un compétiteur Gam42a non marqué, et vis-versa pour assurer une meilleure spécificité car les cibles de ces deux sondes ne diffèrent que d'une base. Le compétiteur NHGC non marqué est utilisé conjointement avec la sonde HGC69a pour les mêmes raisons. Les sondes LGC354 Ae, Be et Ce sont utilisées en mélange équimolaire (MixLGC354). L'hybridation avec le témoin positif MixEUB338 et avec les sondes HGC69a et MixLGC354 était réalisée sans perméabilisation ou après perméabilisation par traitement avec du lysozyme à 10 mg/mL pendant 10 min à température ambiante.

### II-5.2.3. Microscopie confocale et analyse d'images

#### II-5.2.3.a. Acquisition des images en microscopie confocale

Les deux types de marquages fluorescents sont observés à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 510. Pour l'acquisition des images après le marquage de viabilité, les coupons sont vissés à l'extrémité d'une tige métallique elle-même fixée à un micro-manipulateur motorisé permettant le positionnement précis du coupon au-dessus de l'objectif. Un objectif de grossissement 40x à immersion dans l'eau est utilisé, le coupon étant placé directement en contact avec la goutte d'eau déposée sur l'objectif. La fluorescence est excitée par balayage des échantillons à une longueur d'onde de

488 nm et le marquage syto-9 (bactéries vivantes) est détecté à travers un filtre de bande passante 498 – 530 nm tandis que l'iodure de propidium (bactéries mortes) est détecté à travers un filtre de bande passante 594 – 680 nm. La surface de la base de chaque champ observé est de 230  $\mu\text{m}^2$ , des tranches optiques de 1  $\mu\text{m}$  sont acquises sur toute la hauteur du biofilm. Pour chaque hybridation 12 champs sont acquis. Les lames sont observées à l'aide d'un objectif de grossissement 63x à immersion dans l'huile. Le syto-9 est détecté avec les mêmes réglages que ceux cités ci-dessus tandis que le Cy5 est excité à 633 nm et détecté grâce à un filtre ne laissant passer que les longueurs d'ondes supérieures à 650 nm.

#### *II-5.2.3.b. Analyse informatique des images*

L'analyse informatique des images obtenues est réalisée en utilisant plusieurs logiciels. A chaque étape nous avons été contraints d'utiliser des logiciels permettant l'automatisation des procédures car le nombre d'images était très important (plusieurs milliers). Toutes les images sont au format TIFF.

- Préparation des séries d'images à analyser

Les piles d'images correspondant aux biofilms marqués au LIVE/DEAD sont exportées en images individuelles qui sont traitées sous Adobe Photoshop 6.0 afin de sélectionner les pixels rouges et les pixels verts et de créer les images correspondantes en 256 niveaux de gris (Fig. 22). L'automatisation de cette étape est rendue possible grâce aux outils de sélection de plages de couleurs et à la fonction "Scripts". Deux piles d'images correspondant aux deux marquages sont créées sous ImageJ 1.30v (The National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) à partir des images générées. Les seuils de signal positif sont déterminés visuellement pour être ensuite utilisés lors de la détermination de la proportion des aires marquées sous Comstat ([www.im.dtu.dk/mme/](http://www.im.dtu.dk/mme/)). Les deux piles correspondant aux deux marquages sont à nouveau décomposées en  $n$  images individuelles en 256 niveaux de gris. Celles-ci sont renommées par lots grâce au logiciel Irfan View 3.85 ([www.irfanview.com](http://www.irfanview.com)) afin d'être rendues compatibles avec Comstat. Par ailleurs, une nouvelle pile d'images est aussi créée par addition des deux piles seuillées pour l'analyse de l'architecture des biofilms sous Comstat.

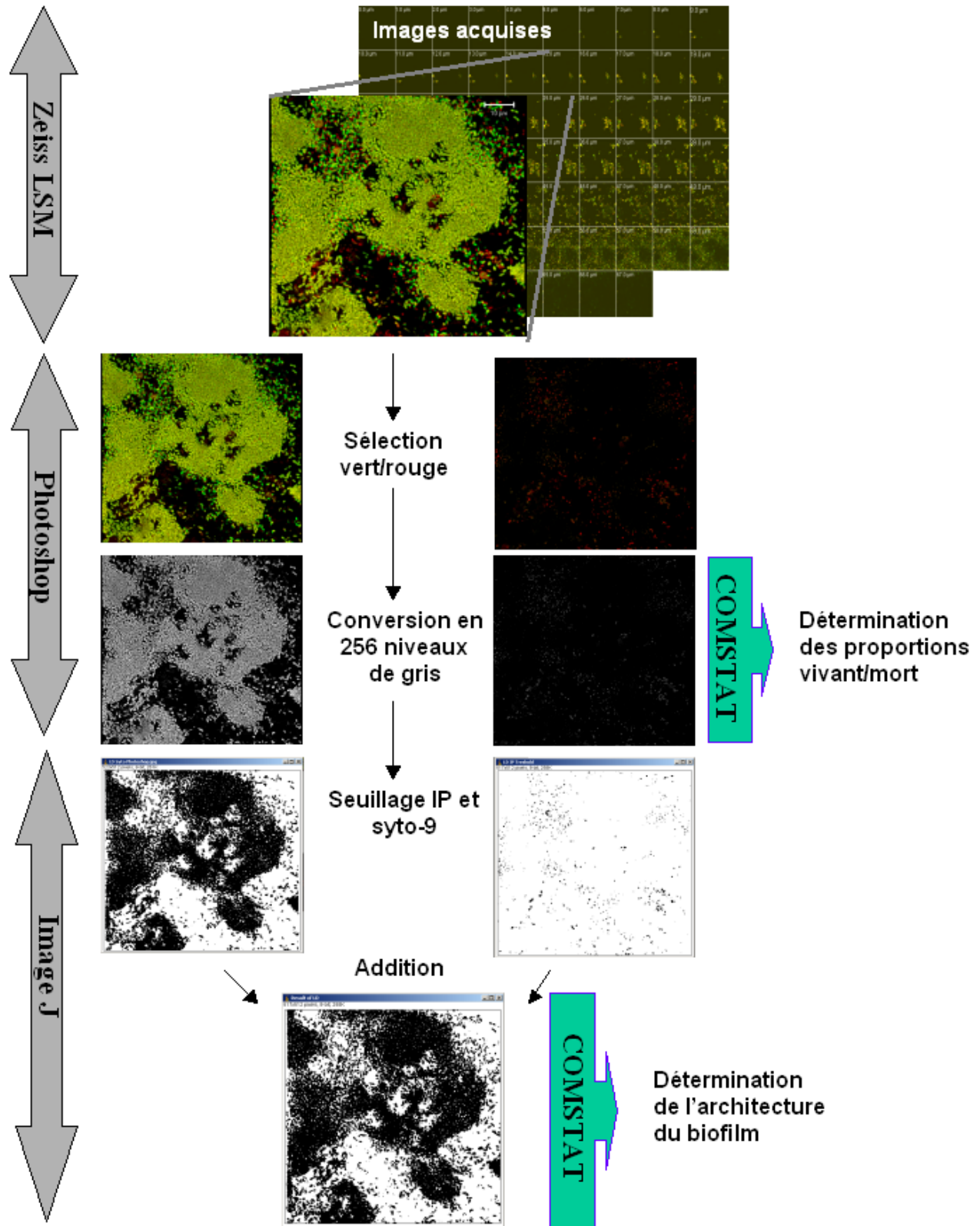


Figure 22 : Procédure d'analyse informatique des images obtenues par marquage LIVE/DEAD des biofilms.

Les images obtenues après hybridation avec les sondes sont préparées différemment (Fig. 23) : elles sont directement importées sous ImageJ grâce à la macro LSM Reader développée par Jérôme Mutterer (<http://ibmp.u-strasbg.fr/sg/microscopie/methods/ij.html>) et deux piles d'images correspondant aux deux marquages sont créées grâce à la macro LSM Fusion développée par le même auteur. Les seuils de signal positif sont déterminés visuellement et les piles d'images en 256 niveaux de gris sont exportées sous forme d'images individuelles destinées à être traitées sous Comstat.

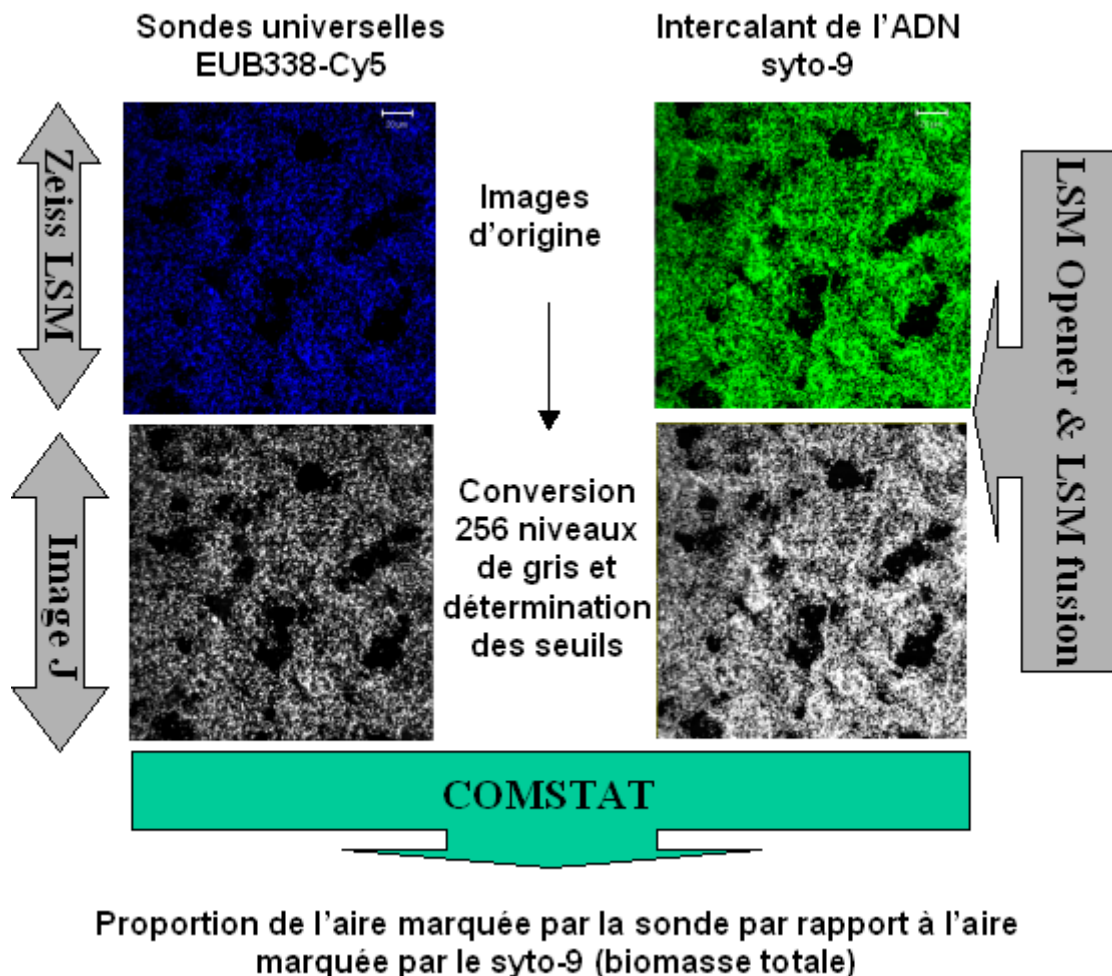


Figure 23 : Procédure d'analyse informatique des images obtenues par marquage des populations des biofilms avec les sondes ARNr.

- Analyse des images sous Comstat

Le logiciel Comstat a été développé par A. Heydorn (Heydorn *et al.* 2000) spécifiquement pour l'analyse des structures des biofilms. Il est disponible sur demande à l'auteur (<http://www.im.dtu.dk/mme/>). C'est une fonction macro qui doit être installée sous MatLab, logiciel commercial. Comstat permet de déterminer de nombreux paramètres relatifs à l'architecture des biofilms et d'effectuer des comparaisons des aires marquées par différents colorants sur un même champ. Dans notre étude nous avons réalisé trois types d'analyses :

1. mesure de l'épaisseur moyenne, de l'épaisseur maximale et de la quantité de biomasse par unité de surface sur les images obtenues par seuillage et reconstitution des champs marqués en LIVE/DEAD (biomasse totale),
2. détermination de la viabilité des biofilms par comparaison des proportions de biomasses marquées par l'IP et par le syto-9,
3. détermination du pourcentage de biomasse marquée par les sondes par rapport à la biomasse totale marquée en syto-9.

La détermination de la valeur du seuil de marquage positif est essentielle dans ces analyses. Lors de l'analyse, Comstat génère des fichiers de données qui sont importés et traités sous Excel grâce à des macros.

### **III- AUTO-INDUCTEURS**

#### **III-1. COMPARAISONS DE SEQUENCES**

La première étape de ce travail a consisté à effectuer des comparaisons de séquences des gènes impliqués dans les cascades de régulation des auto-inducteurs chez d'autres espèces bactériennes avec le génome en cours de séquençage de *L. pneumophila* (<http://genome3.cpmc.columbia.edu/~legion/index.html>). Les résultats de ces alignements nous ont convaincu de l'utilité de réaliser les expériences de détection.

## III-2. SELECTION DES SOUCHES TESTEES POUR LA RECHERCHE D'AUTO-INDUCTEURS

La recherche des auto-inducteurs se fait à partir d'extraits de surnageants de culture des souches testées. Ceux-ci sont mis en présence de souches rapporteurs qui expriment un phénotype particulier facilement détectable en présence des molécules recherchées : production d'un pigment, d'une luminescence, induction d'une activité enzymatique. Afin d'essayer de sélectionner dans notre collection des souches présentant des caractéristiques différentes en culture sur milieu synthétique nous avons réalisé des courbes de croissance en bouillon BCYE (Annexe I). Les souches Lyon H2-II, Lyon H9-II, Lyon L2-I, Nancy 22-I, Paris 2-V et Versailles 2-I utilisées pour la validation de la méthode de typage, ainsi que la souche "Paris" également fournie par le Centre de Référence des Légionelles ont été testées. Les souches ont préalablement été cultivées 7 jours sur gélose BCYE à 37°C, puis diluées en PBS stérile afin d'obtenir une DO<sub>600</sub> de 0,1 (env. 10<sup>8</sup> bactéries / mL). Cette suspension a été utilisée pour ensemercer des tubes de 10 mL de bouillon BCYE avec 10<sup>3</sup> bactéries / mL. Les tubes étaient incubés à 37°C, nous avons suivi l'évolution de la DO<sub>600</sub> pendant 10 jours.

## III-3. RECHERCHE D'AUTO-INDUCTEURS CHEZ *L. PNEUMOPHILA*

### III-3.1. Principe

La recherche des auto-inducteurs de type 1 se fait grâce à plusieurs souches sensibles à différents types d'AI-1 :

- En présence d'acyl-homosérines lactones à chaînes courtes (C4 à C8) et non substituées, *Chromobacterium violaceum* cv026 sécrète un pigment violet, la violacéine, facilement détectable à l'œil nu. En revanche en présence de certaines AHLs à chaîne longue (C10 à C14) cette production de violacéine peut être inhibée. Le gène codant pour la synthèse des AHLs a été inactivé chez cette souche et elle est également munie de deux marqueurs de sélection qui sont des gènes de résistance au chloramphenicol et à la tétracycline. Elle est décrite dans la publication de (McClean *et al.* 1997) et nous a été fournie par D. Kirke, du

Département des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Nottingham, en Angleterre.

- *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 est plus sensible à l'activation par des AHLs substituées en 3 (3-oxo AHLs). Le gène *tral* codant pour la synthèse d'AHLs chez cette souche a été inactivé et un plasmide comportant la fusion *Ptral-lacZ* a été introduit, en même temps qu'un plasmide surexprimant la protéine réceptrice TraR. Les AHLs exogènes se fixent à la protéine réceptrice TraR et il y a expression du promoteur de *tral* couplé à la  $\beta$ -galactosidase, donc hydrolyse du XGal et production d'une coloration bleue visible à l'œil nu. Les plasmides possèdent chacun un gène de résistance à un antibiotique (tétracycline et streptomycine). Chez la souche *Agrobacterium tumefaciens* KYC6 le gène de régulation du complexe *traR/tral* a été muté, avec pour conséquence une surexpression de *tral* et donc une synthèse importante d'AHLs. Cette souche sert de témoin positif pour la sécrétion d'AHLs détectables par *A. tumefaciens* NTL4. Ces deux souches sont décrites dans la publication de (Zhu *et al.* 1998), elle nous ont été fournies par C. Fuqua du Département de Biologie de l'Université de l'Indiana aux Etats-Unis.

La recherche des auto-inducteurs de type 2 est réalisée grâce à 3 souches modifiées de l'espèce *Vibrio harveyi*. Chez cette espèce la présence d'AI-2 exogènes entraîne la production d'une luminescence. La souche BB120 exprime le phénotype sauvage : elle synthétise des auto-inducteurs de type 1 et 2 et possède les récepteurs à ces deux types de signaux, elle est utilisée comme témoin positif. Chez la souche BB152 le gène codant pour la synthèse des AI-1 a été inactivé : la souche ne synthétise donc plus que des AI-2 mais possède toujours les deux récepteurs, elle est aussi utilisée comme témoin positif. Enfin la souche BB170 sert de rapporteur : le récepteur aux AI-1 ayant été inactivé, cette souche produit des AI-1 et -2 mais seuls les AI-2 déclenchent la production d'une luminescence détectable par un luminomètre. Ces souches nous ont été fournies par B. Bassler (Département de Biologie Moléculaire de l'Université de Princeton) et sont décrites dans sa publication (Bassler *et al.* 1997).

### III-3.2. Recherche des AI-1

#### III-3.2.1. Conditions de culture

Les souches sélectionnées suite aux essais de croissance sont ensemencées sur géloses BCYE, puis incubées à 37°C pendant trois jours. Trois repiquages successifs sont ensuite effectués en bouillon BCYE afin de s'assurer de la pureté des cultures utilisées. A chaque repiquage un contrôle de contamination est effectué par coloration de Gram, ensemencement sur gélose BCYE et test d'agglutination au latex. Une fois ces contrôles effectués, 100 µL de suspension bactérienne issue du troisième repiquage sont ensemencés dans 1 L de bouillon BCYE sans charbon actif (Annexe) et incubés à 37°C sous agitation lente.

*Pseudomonas aeruginosa* synthétise habituellement deux types d'AHLs : *N*-(3-oxododecanoyl)-homosérine lactone et *N*-butanoylhomosérine lactone (Wu *et al.* 2000). Nous avons donc utilisé la souche CIPA22 comme témoin positif dans l'essai de détection avec *C. violaceum*. La souche *A. tumefaciens* KYC6 décrite ci-dessus a servi de témoin positif pour la détection avec *A. tumefaciens* NTL4. Ces deux souches sont cultivées dans 1 L de bouillon BCYE pour *P. aeruginosa*, 1 L de bouillon AT pour *A. tumefaciens* KYC6 (Annexe).

Une fois la phase stationnaire atteinte ( $DO_{600nm} > 1$ ), la suspension est répartie dans des tubes de 50 mL stériles, centrifugée à 5000 g pendant 10 min et le surnageant est filtré à 0,22 µm à l'aide d'un système de filtration Millipore en verre muni d'une pompe à vide.

#### III-3.2.2. Extraction des surnageants

La méthode d'extraction a d'abord été mise au point sur BCYE stérile dopé en homosérine lactone purifiée : *N*-hexanoyl homosérine lactone (Aurora Biosciences, Coralville, Etats-Unis) à 10 µM dans 500 mL de BCYE. L'extraction est habituellement réalisée par du dichlorométhane. Ce solvant est délicat à manipuler : il est très volatil, très inflammable et cancérigène. Par ailleurs les quantités nécessaires à l'extraction sont très importantes (1/3 de dichlorométhane pour 2/3 de surnageant). Dans notre étude nous avons donc choisi d'utiliser des cartouches d'extraction : les disques DVB



(divinylbenzène) Bakerbond<sup>®</sup> contenant 300 mg de polymères sont utilisés pour l'extraction des composés polaires et modérément polaires et les disques C<sub>18</sub> Bakerbond<sup>®</sup> contenant 750 mg de silice greffée C<sub>18</sub> pour l'extraction des composés apolaires. Afin d'obtenir une extraction de bonne qualité, les deux phases (C<sub>18</sub> et DVB) sont mises en série, permettant ainsi un spectre de rétention important.

Les deux disques sont conditionnés successivement par 10 mL d'acétonitrile (ACN), 10 mL de méthanol (MeOH) et 20 mL d'eau MilliQ. Le disque C<sub>18</sub> est ensuite superposé sur le disque DVB puis l'échantillon (1 L) est percolé à un débit d'environ 50 mL/min. Chaque disque est ensuite séché séparément sous vide pendant 5 min puis élué à 3 reprises avec 3 mL de dichlorométhane pour la cartouche C<sub>18</sub>, 3 mL d'ACN pour la cartouche DVB. Les extraits sont alors évaporés à sec sous flux d'azote et repris dans 1 mL d'acétate d'éthyle + 0,01% d'acide acétique glacial. Puis les flacons sont agités pendant 30 min afin de bien resuspendre le résidu. Le solvant est de nouveau évaporé sous azote et le résidu sec est finalement repris dans 110 µL d'acétate d'éthyle + 0,01% d'acide acétique glacial, pour être conservé à – 20°C jusqu'à utilisation.

### III-3.2.3. Fractionnement HPLC

Le fractionnement en HPLC (chaîne HPLC Spectra Systems P1000XR couplée à un détecteur UV Waters<sup>™</sup> 486) a pour but de séparer les composés actifs éventuellement présents en fonction de leur hydrophobicité. On évite ainsi une possible inhibition de l'activité des AHLs à chaîne courte par les AHLs à chaîne longue. La colonne C8 Kromasil (5 µm, 12,5 cm x 4,5 mm, Macherey-Nagel) est d'abord rincée avec de l'ACN pur pendant 10 min à un débit de 1 mL/min. 100 µL d'échantillon sont ensuite introduits dans la colonne. L'élution est réalisée par un gradient linéaire d'ACN dans l'eau MilliQ : passage de 20% à 95% d'ACN dans l'eau sur une durée de 30 min, avec un débit de 1 mL/min. Six fractions (une toutes les 5 min) sont collectées dans des tubes stériles, l'évolution de l'absorbance de l'éluat à 210 nm est enregistrée.

### III-3.2.4. Test des fractions en présence des souches rapporteurs

Les six fractions obtenues par élution en HPLC sont évaporées sous flux d'azote à 35°C (évaporation de l'ACN) et lyophilisées par la suite (évaporation de l'eau). 120 µL de milieu LB liquide stérile sont ajoutés dans les tubes contenant les différentes fractions. Ces tubes sont centrifugés à 5000 g pendant 10 min afin de culotter le LB au fond du tube, puis une filtration stérilisante est réalisée grâce à des microfiltres 0,22 µm (Millipore).

#### *III-3.2.4.a. Tests avec la souche rapporteur C. violaceum*

Dix ml de milieu LB à 1,5% d'agarose sont coulés dans des boîtes de Pétri. Une fois la gélose solidifiée, 7 mL de LB à 0,3% d'agarose contenant 50 µL de la souche rapporteur *C. violaceum* (cultivée 16 h à 30°C en TY,  $DO_{600} > 1$ ) sont coulés sur la première couche. Après prise en masse deux puits diamétralement opposés sont réalisés à l'aide d'un scalpel stérile, puis 50 µL de fraction à tester sont déposés dans ces puits. Les géloses sont incubées 24 h à 37°C. Le test d'inhibition de la production de violacéine par *C. violaceum* cv026 est réalisé sur l'extrait brut non fractionné en HPLC, 500 nM de 3-oxo-N-hexanoyl-L-homosérine lactone sont ajoutés au milieu LB à 0,3% d'agarose afin d'induire la pigmentation.

#### *III-3.2.4.b. Test avec la souche rapporteur A. tumefaciens*

La souche rapporteur est ensemencée sous forme d'une ligne médiane sur une gélose AT plus X-Gal (Annexe I). Deux puits stériles sont réalisés de part et d'autre de la ligne d'ensemencement et remplis de 50 µL de la fraction à tester. L'incubation dure 24 à 48 h à 30°C.

### **III-3.3. Recherche des AI-2**

La production des AI-2 peut varier considérablement en fonction de la phase de croissance, il faut donc réaliser une cinétique de croissance des souches à tester et prélever des surnageants de culture à chaque point de cette cinétique. Par ailleurs cette

production d'AI-2 est très sensible à la composition du milieu de culture utilisé : en fonction de la source de carbone disponible une même souche pourra produire ou non des AI-2. La multiplicité des conditions à tester nous a donc amené à sélectionner une seule souche pour effectuer tous les tests de recherche : la souche "Paris".

#### III-3.3.1. Croissance des légionelles en bouillon nutritif

La souche est préparée de la même façon que lors de la recherche d'AI-1 puisensemencée à une concentration de  $10^3$  bactéries /mL dans 10 mL de BCYE, 10 mL de BCYE + 0,5% de glucose ou encore 10 mL de BCYE + 1 mM d'acide borique. Une cinétique de croissance est réalisée sur 14 jours. Tous les jours un tube correspondant à chaque type d'échantillon est centrifugé à 5000 g pendant 10 min et le surnageant est filtré à  $0.22 \mu\text{m}$  puis stocké à  $-20^\circ\text{C}$ .

#### III-3.3.2. Croissance intra-amibienne des légionelles

La multiplication des légionelles dans les amibes est extrêmement efficace : en 24 à 48 h la quantité de légionelles peut être multipliée par  $10^3$  à  $10^4$  suite à la multiplication intra-cellulaire. L'amibe constitue donc un milieu nutritif particulier dans lequel la production d'AI-2 pourrait avoir lieu. Afin de tester cette hypothèse nous avons réalisé des tests de détection des AI-2 sur des surnageants provenant de cultures intra-amibiennes de légionelles.

La souche amibienne *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 est cultivée à  $25^\circ\text{C}$  en bouillon PYG712 (Annexe I). Le test d'invasion est réalisé sur cellules arrivées à confluence en flasque stérile de  $25 \text{ cm}^2$  (environ  $10^6$  cellules déposées sur le fond de la flasque). Le milieu de culture est retiré et remplacé par 4 mL de tampon salin PYG sans nutriments afin d'affamer les amibes. Après 30 min d'incubation à  $25^\circ\text{C}$ , 1 mL d'une suspension de *L. pneumophila* de  $\text{DO}_{600} = 1$  en PYG salin est ajouté (multiplicité d'infection : environ 100 *L. pneumophila* pour une amibe). La flasque est incubée 2 h à  $37^\circ\text{C}$  afin de permettre aux légionelles d'infecter les amibes. De la gentamicine est ensuite ajoutée à une concentration de  $100 \mu\text{g/mL}$  pendant 2 h à  $37^\circ\text{C}$  afin de tuer les légionelles qui n'ont pas pénétré dans les amibes. Le tampon est retiré, les cellules sont

rincées 1 fois avec du tampon salin neuf et mises à incuber à 37°C dans 5 mL de PYG712.

Après incubation pendant 2, 16, 24, 48 et 120 h les amibes sont décrochées par grattage avec un râteau stérile et lysées par trois passages successifs de la suspension dans une aiguille (calibre 27). Les légionelles sont dénombrées sur gélose BCYE et le surnageant de culture est centrifugé à 5000 g pendant 10 min puis filtré à 0,22 µm. Ce surnageant est ensuite testé pour la détection d'AI-2.

### III-3.3.3. Détection des AI-2

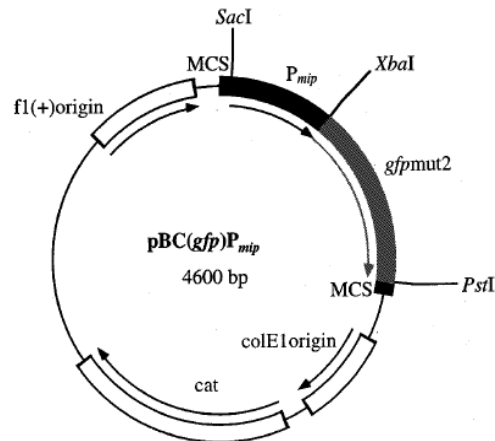
La veille du test les deux souches BB120 et BB170 sontensemencées dans 10 mL de milieu AB (Annexe I) et incubées toute la nuit à 30°C sous agitation. Le lendemain la  $DO_{600}$  des bouillons doit être > 1. La souche BB120 sert de témoin positif : le bouillon est centrifugé 10 min à 5000 g et le surnageant est filtré à 0,22 µm pour être testé en présence de BB170. La souche BB170 est diluée au 1/5000 et 180 µL de cette dilution sont distribués dans une plaque stérile de 96 puits de type NUNC à l'aide d'une micropipette multicanaux. 20 µL des échantillons à tester sont ensuite ajoutés et la plaque est incubée à 30°C sous agitation. La luminescence est mesurée toutes les heures pendant 8 à 9 heures à l'aide d'un luminomètre à plaques Microlumat plus LB 96V (Berthold).

### **III-3.4. Influence d'auto-inducteurs exogènes sur la multiplication intra-amibienne de *L. pneumophila***

#### III-3.4.1. Souche de *L. pneumophila* utilisée

Il nous a paru intéressant de pouvoir visualiser directement la multiplication de *L. pneumophila* dans l'amibe. Nous avons donc sollicité M. Steinert (Institut für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg, Allemagne) qui nous a fait parvenir une souche JR32 (souche modérément virulente) modifiée par introduction d'un plasmide sur lequel le promoteur du gène *mip* a été introduit en amont du gène codant pour la Green Fluorescent Protein *mut2* (GFP) (Fig. 24). Cette souche, décrite dans la

publication de (Kohler *et al.* 2000), a permis la visualisation des *L. pneumophila* pendant l'invasion des amibes et le suivi de l'expression du gène *mip* par mesure de l'intensité de la fluorescence en cytométrie de flux.



**Figure 24 : Représentation de la construction plasmidique introduite dans la souche *L. pneumophila* JR32 (Kohler *et al.* 2000).**

### III-3.4.2. Influence de l'incubation de *L. pneumophila*-GFP avec des AI-1

Quatre types d'AI-1 ont été utilisés (Aurora Biosciences, Coralville, Etats-Unis) :

- |                        |   |
|------------------------|---|
| - AHL à chaîne courte  | <i>N</i> -Hexanoyl-L-homosérine lactone         |
| - AHL à chaîne courte  | <i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-L-homosérine lactone  |
| - AHL à chaîne moyenne | <i>N</i> -Octanoyl-L-homosérine lactone         |
| - AHL à chaîne longue  | <i>N</i> -(3-Oxododécanyl)-L-homosérine lactone |

Ces molécules sont conservées en solution dans de l'acétate d'éthyle et de l'acide acétique glacial à 0.01% à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les suspensions d'AI-1 sont préparées pour le test par ajout des solutions mères dans 1 mL de BCYE stérile et chauffage à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 2 h afin d'évaporer le solvant. Une suspension de *L. pneumophila* GFP de  $\text{DO}_{600}$  0,1 est préparée en bouillon BCYE et 10 mL de cette suspension sont incubés pendant 16 h à  $37^{\circ}\text{C}$  avec 10 ou 50  $\mu\text{M}$  d'AI-1 ajoutés à partir de la suspension en BCYE. Le test d'invasion des amibes est ensuite réalisé de la même manière que décrite ci-dessus. L'observation est réalisée directement dans les flasques grâce à un microscope inversé

à fluorescence (Nikon TE 200) et les légionelles sont dénombrées après 4 et 24 h d'incubation.

#### III-3.4.3. Influence de l'incubation de *L. pneumophila* -GFP avec des AI-2

Les AI-2 ne sont pas disponibles dans le commerce. Nous avons donc utilisé la souche *V. harveyi* BB152 qui produit naturellement des AI-2 et dont le gène codant pour la synthèse d'AI-1 a été inactivé. Après une nuit d'incubation en milieu AB à 30°C sous agitation le surnageant de culture est stérilisé par filtration à 0,22 µm. 100 µL ou 1 mL sont ensuite ajoutés à 9 mL d'une suspension de *L. pneumophila* GFP de DO<sub>600</sub> 0,1 et incubés 16 h à 37°C. Le test d'invasion est réalisé de la même manière que pour les AI-1.

# CHAPITRE III

## Résultats et Discussions

# CHAPITRE III

## 1<sup>ère</sup> Partie

### Suivi de la contamination d'un réseau intérieur



## **I- MISE EN PLACE ET VALIDATION DE LA METHODE DE TYPAGE**

Une revue rapide de la littérature nous a amené à choisir la méthode d'AP - PCR décrite par Lawrence *et al.* (1999) pour le typage des souches isolées lors des différentes campagnes d'analyse. Cette méthode présente de nombreux avantages : de réalisation simple et rapide, son pouvoir discriminant est élevé grâce à l'utilisation conjointe de trois amorces.

La collection de souches de *L. pneumophila* sérogroupe 1 fournie par le Centre de Référence des Légionelles (Lyon) a été traitée en AP-PCR. La migration des 9 produits d'amplification en gel d'agarose 2% a permis de distinguer 6 profils différents (Fig. 25). Les profils correspondants aux souches Lyon H9-II et Lyon H2-II, Nancy 22-I et Nancy 12-I, et Paris 9-XXIV et Paris 2-V sont identiques avec les trois amorces. Après vérification auprès du Centre National de Référence il s'est avéré que les souches sont effectivement identiques en PFGE, la méthode a donc été considérée comme valide. Les profils les plus complexes sont obtenus avec l'amorce IR6110. Un dendrogramme a été réalisé au Centre de Référence à partir des profils obtenus avec l'amorce B1245 car la complexité moins importante des profils permet une sélection plus aisée des bandes prises en compte dans l'analyse (Fig. 26). Le logiciel Taxotron (Institut Pasteur, Paris) a été utilisé, il permet l'évaluation du pourcentage de similitude des souches en fonction de la complexité des profils de migration. Les paramètres de l'analyse sont les mêmes que ceux décrits dans la publication de Lo Presti *et al.* (1997) : utilisation du coefficient de corrélation de Dice pour l'attribution de valeurs à chaque bande en fonction de sa représentation dans le groupe analysé.

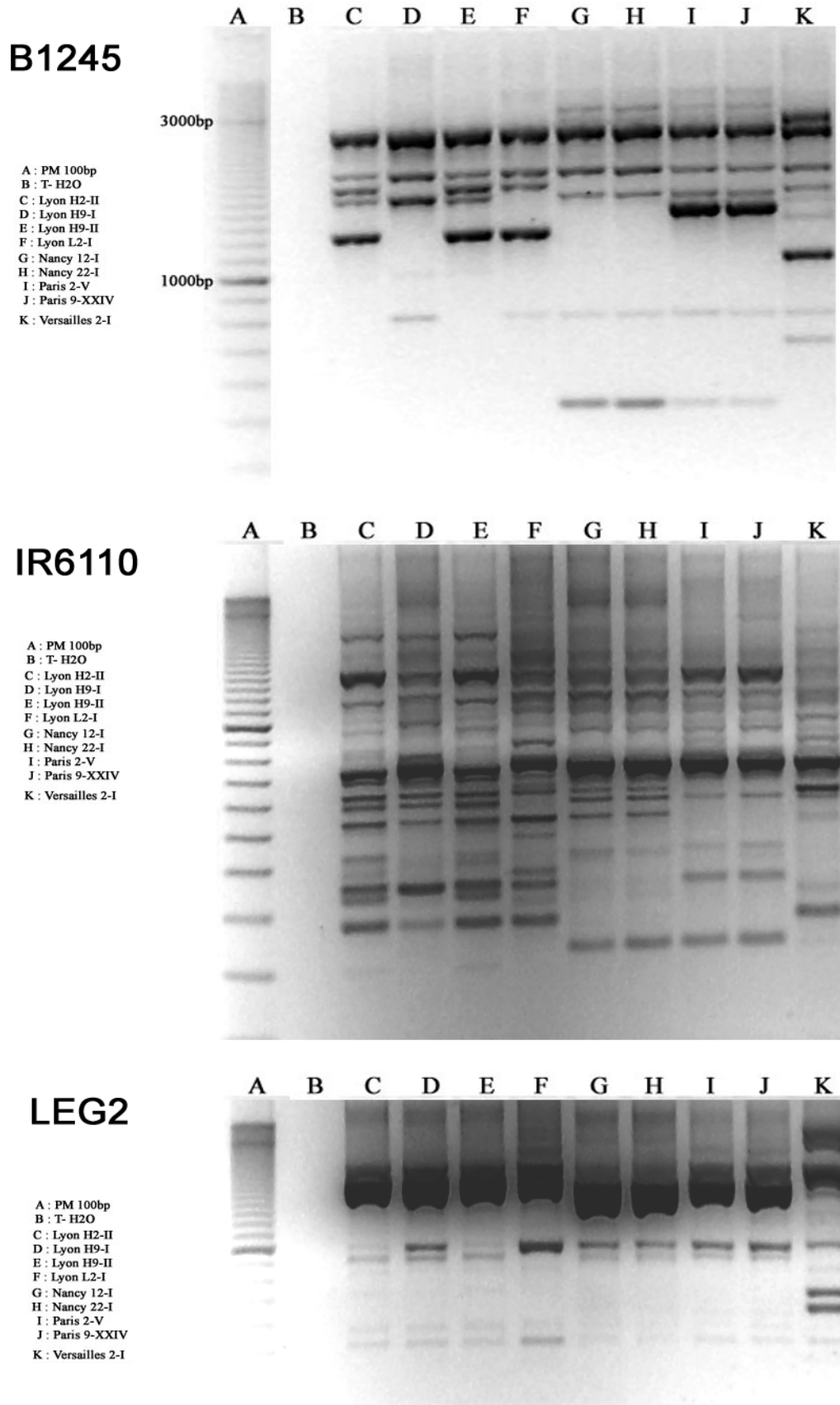


Figure 25 : Profils AP-PCR des souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 fournies par le Centre National de Référence.

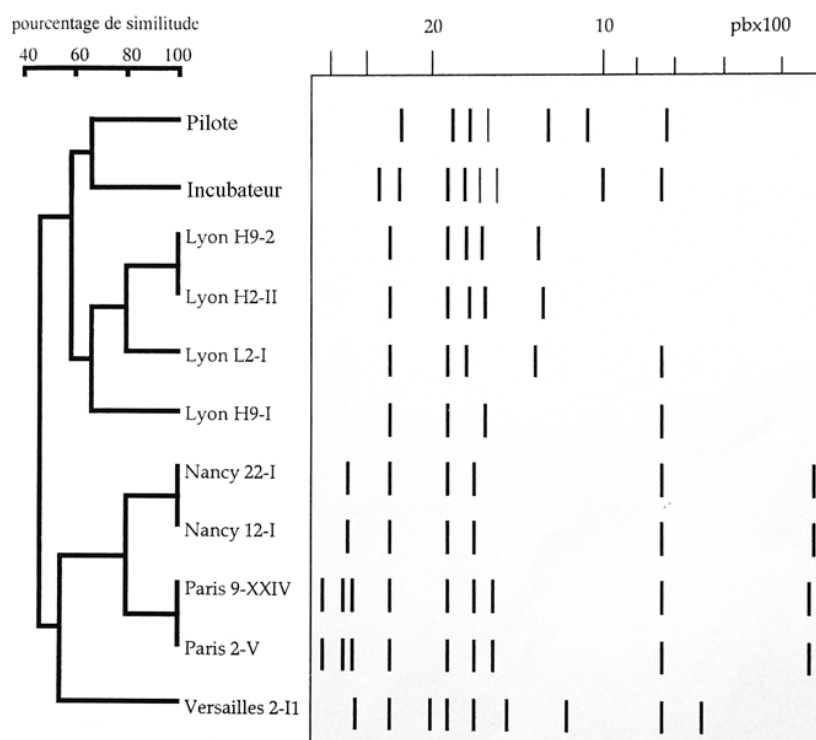


Figure 26 : Dendrogramme et représentation schématique des profils AP-PCR B1245 des 9 souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 fournies par le Centre de Référence et des deux souches séro groupe 2-14 isolées lors des études sur incubateurs en réseau ("Incubateur") et dans la boucle utilisée pour les tests de colonisation par différentes souches de *L. pneumophila* ("Pilote").

## II- SUIVI DE LA CONTAMINATION D'UN RESEAU INTERIEUR

### II-1. METHODES CLASSIQUES DE SUIVI DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DE L'EAU ET DES BIOFILMS

#### II-1.1. Incubateur Eau Froide

##### II-1.1.1. Détection des légionelles

Parmi tous les prélèvements réalisés en eau froide en amont et en aval de l'incubateur, aucun n'a permis de détecter des légionelles par culture (Fig. 27). Sur les biofilms, seuls 4 prélèvements se sont révélés faiblement contaminés à 0 (5 ufc/cm<sup>2</sup>), 14 (8 ufc/cm<sup>2</sup>), 122 (2,5 ufc/cm<sup>2</sup>) et 212 (5,3 ufc/cm<sup>2</sup>) jours. Le seuil de détection théorique de la méthode étant de 2,5 ufc/cm<sup>2</sup>, tous ces prélèvements sont considérés comme positifs mais les valeurs ne présentent aucune différence significative.

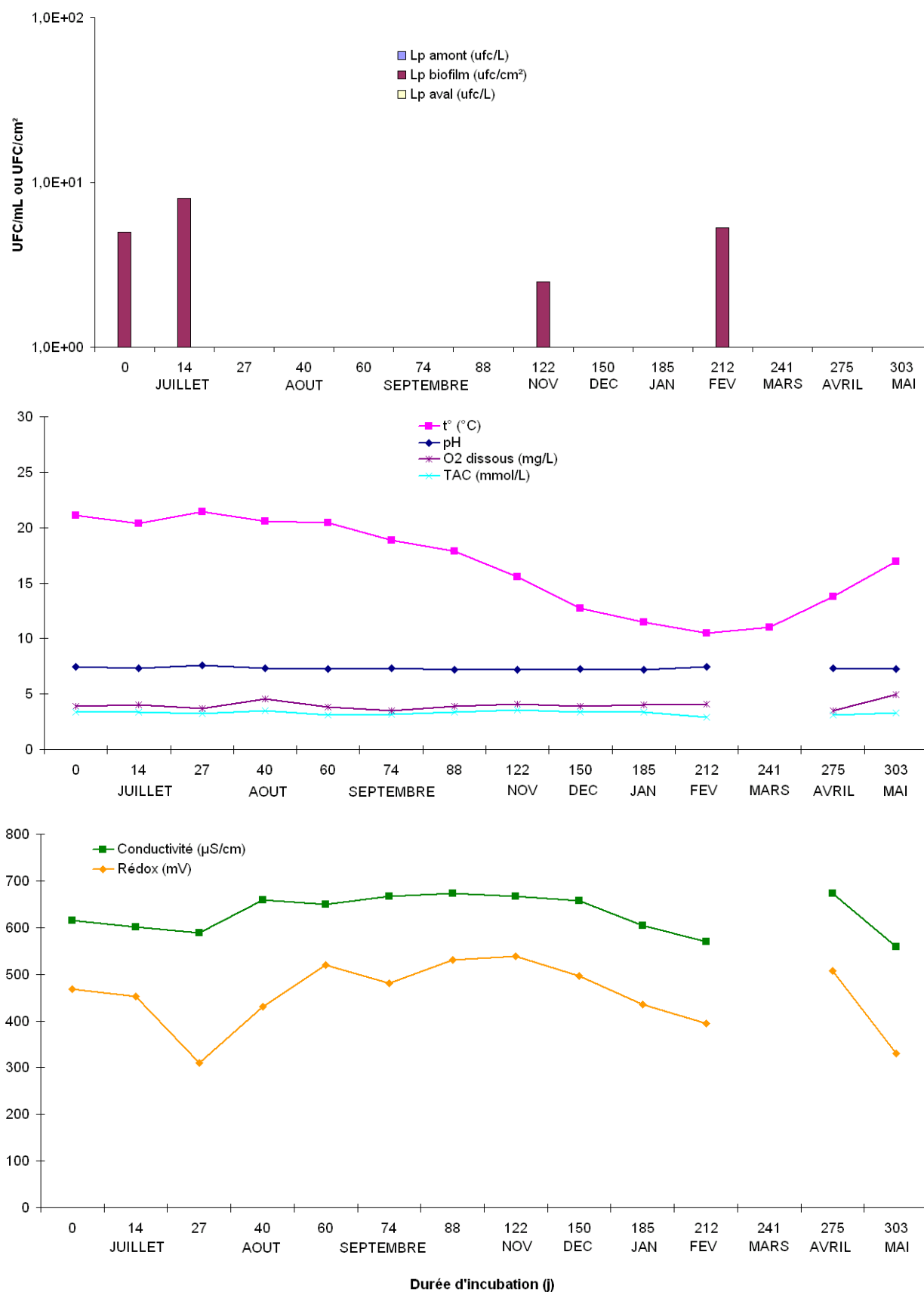


Figure 27 : Résultats des dénombrements des légionelles dans l'eau et les biofilms par méthode AFNOR, et des analyses physico-chimiques réalisées sur l'eau froide. Les analyses physico-chimiques n'ont pas été réalisées à J241, seule la température a été relevée.

### II-1.1.2. Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques sont restés relativement constants pendant toute la durée de l'étude. Les quelques variations observées concernent le potentiel redox et la température, elles ne sont pas en relation avec la détection de légionelles dans les biofilms. La température a varié en relation avec la température extérieure : en début d'étude (mois de juillet) elle est de 20°C environ, puis diminue progressivement jusqu'à 10,5°C à J212 (début février) et augmente à 17°C en fin d'étude (début mai). Les valeurs moyennes calculées pour les autres paramètres relevés pendant l'étude sont reportées dans le tableau X. Les valeurs des résiduels de chlore (libre et total) sont toujours restées inférieures à 0,05 mg/L, nous ne les reportons donc pas dans le tableau de synthèse.

**Tableau X : Moyennes et écart-types sur toute la durée de l'étude des paramètres physico-chimiques relevés en eau froide et en eau chaude**

	Eau froide		Eau chaude	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
t° (°C)	16,6	3,9	42,6	2,3
pH	7,3	0,1	7,3	0,1
O2 dissous (mg/L)	6,6	0,6	6,4	0,5
TAC (mmol/L)	5,5	0,3	5,4	0,3
Conductivité (µS/cm)	629	40	619	33
Rédox (mV)	453	70	458	62

## II-1.2. Incubateur eau chaude

### II-1.2.1. Détection des légionelles

Les résultats obtenus pour le suivi de l'évolution de la colonisation de l'incubateur placé sur le circuit d'eau chaude en utilisant la norme AFNOR sont reportés sur la figure 28. Durant les 300 jours qu'a duré l'étude cette colonisation a considérablement varié. L'incubateur fonctionne comme un véritable "amplificateur" de légionelles : alors que 8 prélèvements d'eau sur 14 sont positifs en amont du dispositif, 13 le sont en aval. Les quantités de légionelles dénombrées sont toujours plus importantes en aval de l'incubateur :  $10^2$  à  $10^4$  ufc/L en amont (moyenne des prélèvements positifs pour toute la durée de l'étude :  $1,28 \cdot 10^3 \pm 2,26 \cdot 10^3$ , moyenne de tous les prélèvements :  $7,32 \cdot 10^2 \pm 1,82 \cdot 10^3$ ) contre  $10^2$  à  $10^5$  ufc/L en aval (moyenne des prélèvements positifs :  $1,87 \cdot 10^5 \pm 3,12 \cdot 10^5$ , de tous les prélèvements :  $1,74 \cdot 10^5 \pm 3,05 \cdot 10^5$ ).

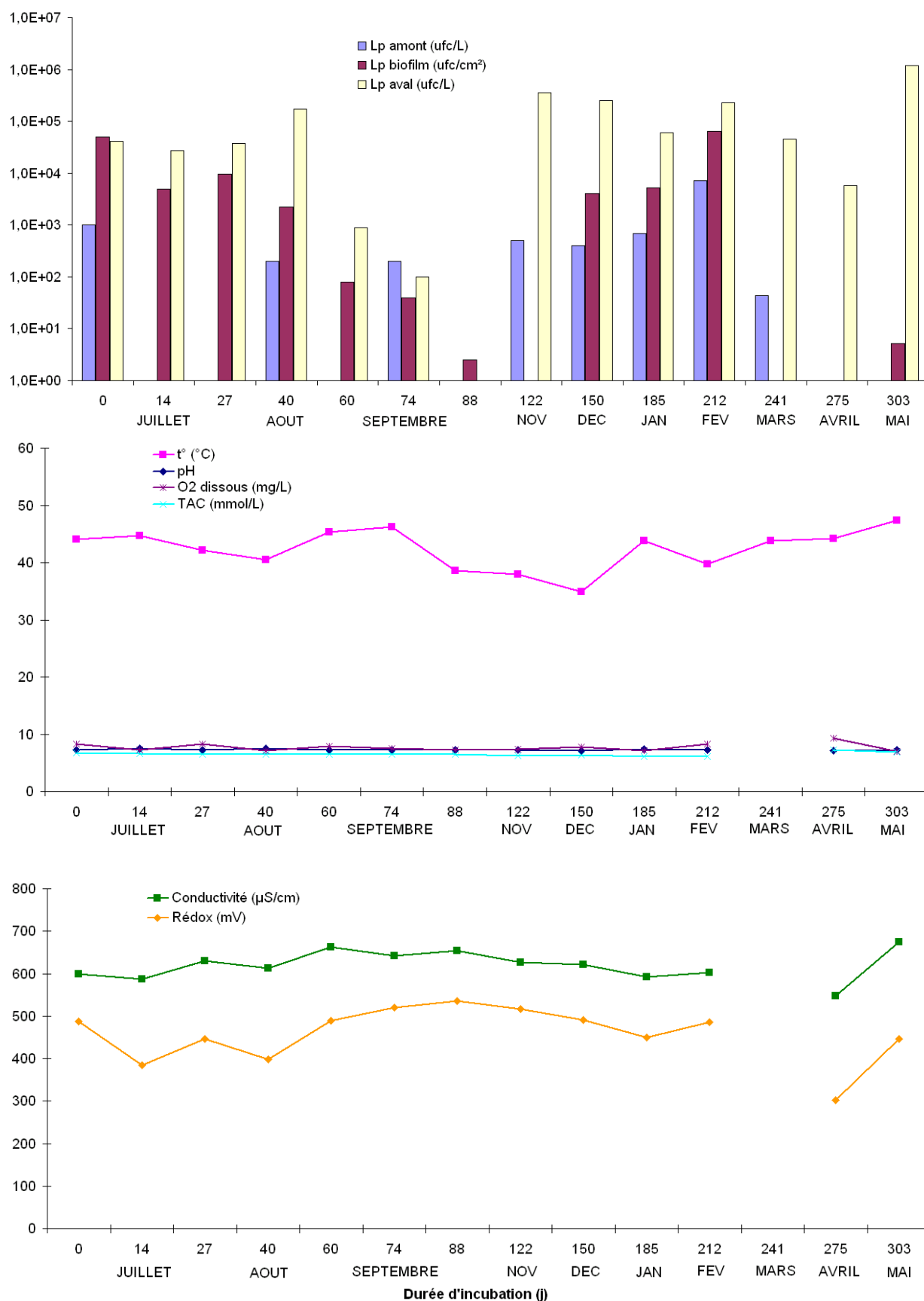


Figure 28 : Résultats des dénombrements des légionelles dans l'eau et les biofilms par méthode AFNOR, et des analyses physico-chimiques réalisés sur l'eau chaude. Les analyses physico-chimiques n'ont pas été réalisées à J241, seule la température a été relevée.

Les dénombrements des biofilms sont aussi très variables : les légionelles sont cultivées à partir de 11 prélèvements sur 14, avec des valeurs comprises entre 2,5 (limite de détection) et  $5.10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> (moyenne des prélèvements positifs :  $1,27.10^4 \pm 2,13.10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>, de tous les prélèvements :  $1,00.10^4 \pm 1,96.10^4$ ).

Les prélèvements réalisés à J88, J122, J241 et J275 montrent que la contamination du biofilm n'est pas directement corrélée avec celle de l'eau : à J88 seul le biofilm est contaminé alors que dans les autres cas seule l'eau en aval de l'incubateur présente une contamination. Il est assez étonnant de constater qu'à J122 et J241 *L. pneumophila* est détectée par culture aussi bien en aval qu'en amont de l'incubateur alors qu'elle ne l'est pas dans le biofilm.

#### II-1.2.2. Paramètres physico-chimiques

De la même façon que pour l'incubateur placé en eau froide les paramètres physico-chimiques mesurés sont restés relativement stables pendant l'étude. Seuls le potentiel redox et la température ont varié. L'amplitude de l'écart de températures est de plus de 10°C, avec une valeur minimale (34,9°C) à J150 et une valeur maximale (47,4°C) à J303. Ces écarts ne sont pas en relation avec les variations observées dans les dénombrements.

## II-2. TYPAGE DES COLONIES ISOLEES

Environ 150 colonies ont été traitées en typage AP-PCR. Un test d'agglutination au latex était systématiquement réalisé sur les colonies avant extraction de l'ADN : toutes les colonies sans exception appartiennent au séro groupe 2-14. Les résultats obtenus en typage confirment cette homogénéité : toutes les colonies testées présentent le même profil AP-PCR avec l'amorce B1245 (Fig. 26, souche "Incubateur"). A partir de la quatrième date de prélèvement, les réactions de typage ont été réalisées uniquement avec cette amorce, les deux autres amorces n'étant plus utilisées que pour confirmer l'identité en cas de doute.

## II-3. HYBRIDATION *IN SITU* FLUORESCENTE

### II-3.1. Validation des sondes

L'efficacité du marquage par les sondes a été évaluée à l'aide d'une méthode que nous avons mise au point et qui est appliquée en routine au sein du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté : hybridation avec des sondes marquées FITC et détection en cytométrie en flux après marquage des cellules avec de l'iodure de propidium. Cette méthode est détaillée dans l'article n°1 figurant en Annexe V. Pour chaque analyse 200 000 évènements sont comptés. Les résultats du comptage après hybridation sur culture pure en phase de croissance exponentielle de la souche isolée dans le réseau sont représentés sur la figure 29 :

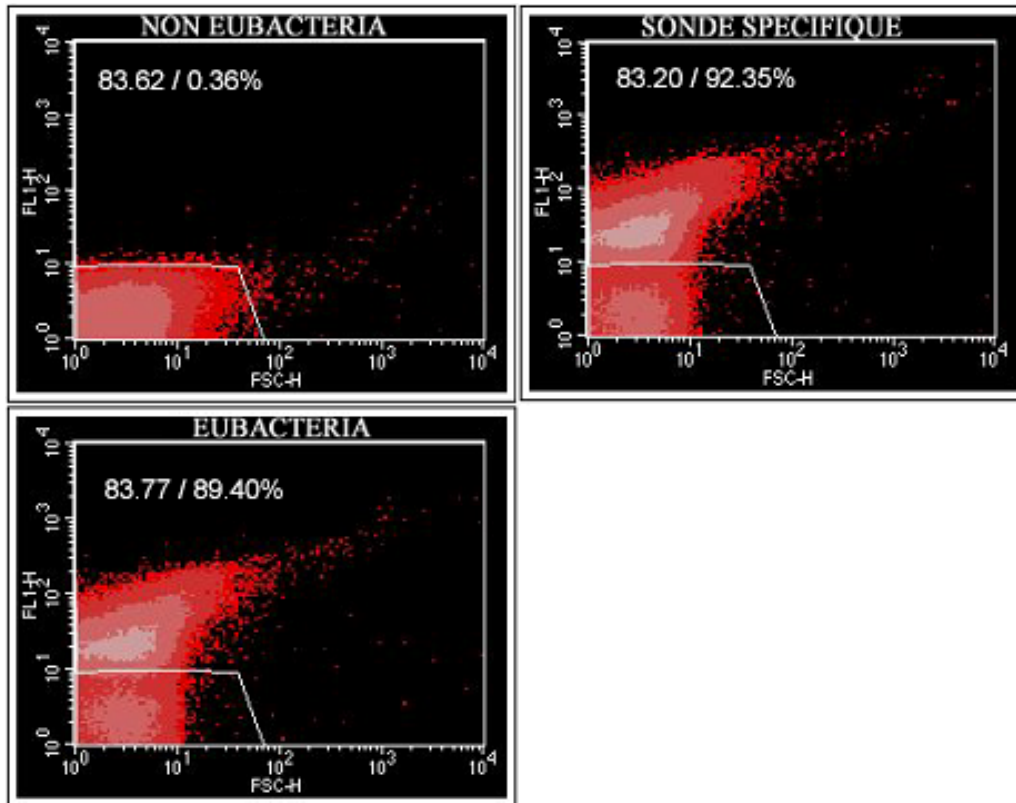


Figure 29 : Détection et comptage en cytométrie en flux d'une culture pure de *L. pneumophila* (souche réseau) après hybridation avec les sondes Non338 (témoin négatif), EUB338 (Témoin positif) et LEGPNE1 (sonde spécifique). En ordonnée (FL1-H) : intensité de la fluorescence conférée par les sondes FITC. En abscisse (FSC-H) : paramètre physique fonction de la morphologie des cellules. Seuls les évènements marqués par l'iodure de propidium et situés au-dessus de la ligne blanche délimitant le seuil de signal négatif en FITC sont pris en compte pour le comptage. Sur chaque diagramme, le pourcentage d'évènements marqués par l'IP est indiqué à gauche, le pourcentage d'évènements marqués sonde-FITC au sein des évènements IP à droite.



Ces résultats valident l'efficacité de la sonde spécifique : avec les réglages utilisés, seulement 0,36% des événements marqués par l'IP présentent une fluorescence après hybridation avec le témoin négatif Non338, tandis que ces pourcentages sont respectivement de 89,40 et 92,35% après hybridation avec les sondes EUB338 et LEGPNE1.

### II-3.2. Hybridations sur biofilms

Durant la première phase de l'expérimentation (jusqu'à J88) les prélèvements étaient effectués tous les 15 jours, puis ils ont par la suite été espacés tous les mois. Ce changement dans la fréquence des prélèvements induit un changement dans l'âge des biofilms analysés : 1,5 mois, 2 mois et 2,5 mois à J0, J14 et J27, 1,5 mois entre J40 et J88, 2 et 2,5 mois à J122 et J150, et 3 mois pour les biofilms prélevés entre J185 et J303.

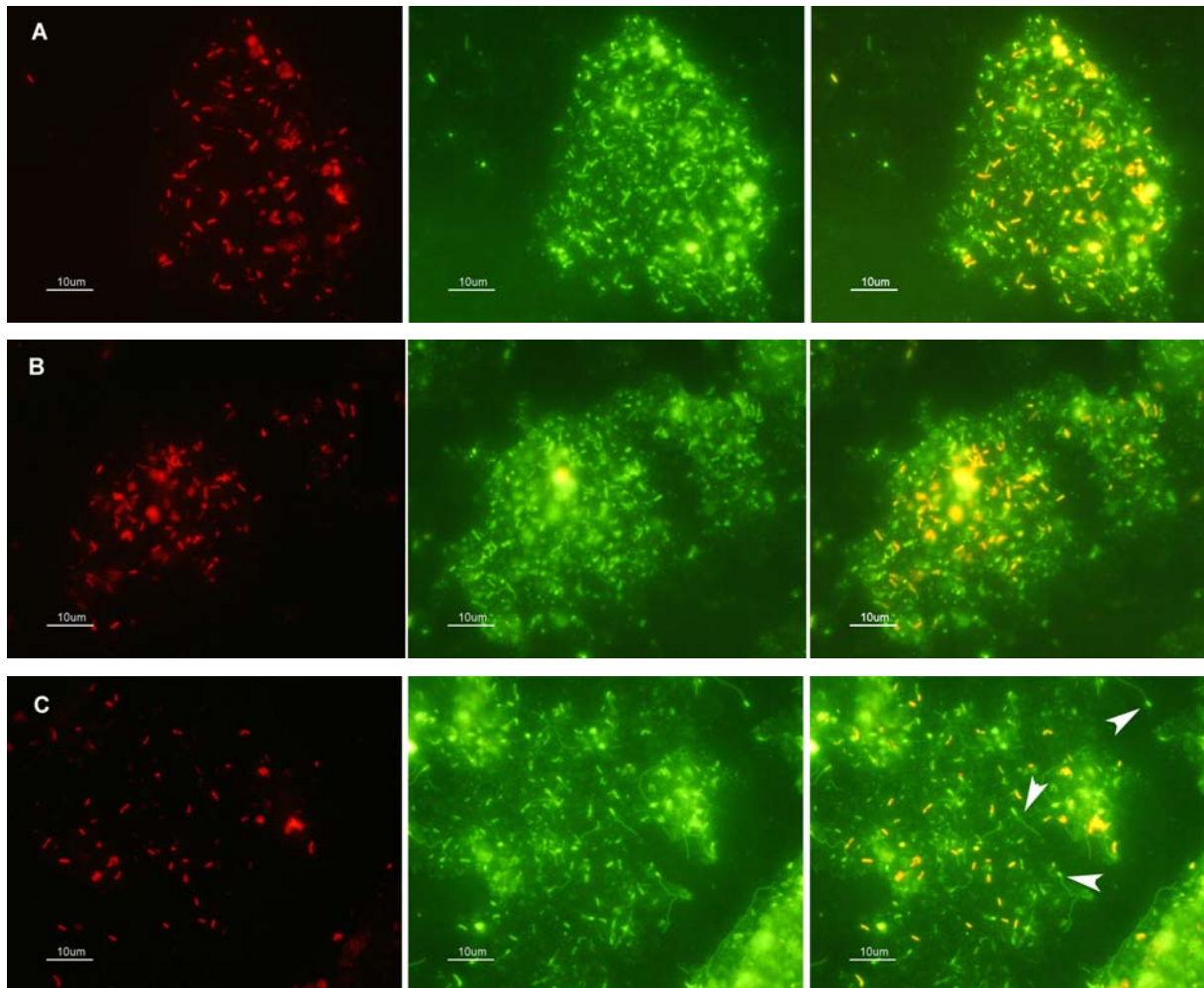
Pour les deux types de biofilms : eau froide et eau chaude, nous avons choisi de travailler sur les échantillons revivifiés car le signal obtenu après hybridation avec la sonde EUB338 des échantillons fixés dès le prélèvement s'est avéré très médiocre. La perméabilisation au lysozyme n'améliorant pas le signal, elle n'a pas été utilisée. L'hybridation avec la sonde témoin négatif Non338 a toujours donné lieu à l'observation de petits spots autofluorescents. Ils sont en faible nombre comparativement aux bactéries marquées par EUB338, en nombre plus important comparativement aux bactéries marquées par LEGPNE1 et peuvent donc entraîner une confusion dans l'interprétation des résultats. Nos estimations de la contamination par *L. pneumophila* (Tab. XI) ne tiennent donc compte que des bactéries hybridées présentant une forme bacillaire typique (Fig. 30).

**Tableau XI : résultats semi-quantitatifs observés après hybridation des biofilms prélevés en eau chaude et en eau froide avec la sonde universelle EUB338 ou la sonde spécifique LEGPNE1 et contre marquage syto-9**

	J0	J14	J27	J40	J60	J74	J88	J122	J150	J185	J212	J241	J275	J303
EC														
Syto9	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+
EUB338	++	+++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
LEGPNE1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EF														
Syto9	++	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+
EUB338	+	+	+	+	+	++	-	+	-	-	-	-	-	-
LEGPNE1	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

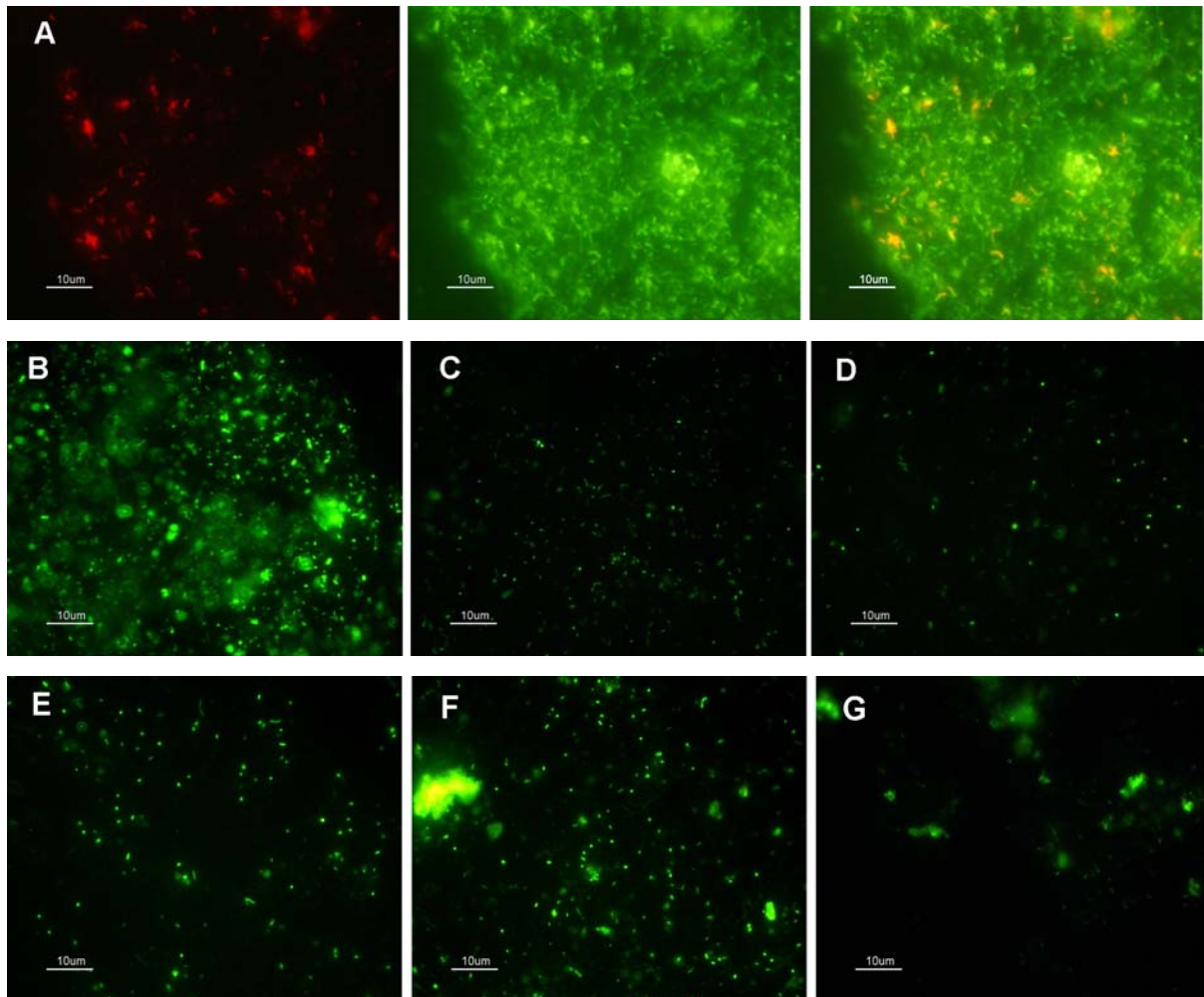
## II-3.2.1. Sonde EUB338

Jusqu'à J74 l'hybridation des biofilms issus du réseau d'eau chaude avec la sonde EUB338 donne des résultats relativement constants (Fig. 30 A et B) : hybridation d'un nombre important de cellules au sein d'agrégats relativement peu denses. Des structures marquées au syto-9 mais qui ne sont pas révélées par la sonde sont observées, sans qu'il soit possible de déterminer s'il s'agit de bactéries. Les cellules marquées par le syto-9 sont moins nombreuses dans les biofilms provenant de l'incubateur eau froide, par ailleurs nous avons observé dans tous ces prélèvements des micro-organismes présentant un aspect de cellule eucaryote qui n'hybrident pas avec EUB338 (Fig. 30 C).



**Figure 30 : Aspect des biofilms hybridés avec la sonde EUB338. Colonne de gauche : marquage par la sonde, colonne centrale : marquage syto-9, colonne de droite : superposition des deux marquages. A et B : biofilms provenant de l'incubateur en eau chaude, prélevés à J27 et J60. C : biofilm provenant de l'incubateur en eau froide, J27, flèches : micro-organismes de type eucaryote non marqués par la sonde EUB338.**

A J88 le nombre de bactéries marquées par la sonde au sein des biofilms issus du réseau d'eau chaude semble réduit par rapport aux prélèvements précédents (Fig. 31 A). Les prélèvements réalisés par la suite montrent une diminution très importante des quantités de cellules marquées par le syto-9 aussi bien en eau chaude qu'en eau froide, et les cellules encore présentes sont complètement réfractaires à l'hybridation.

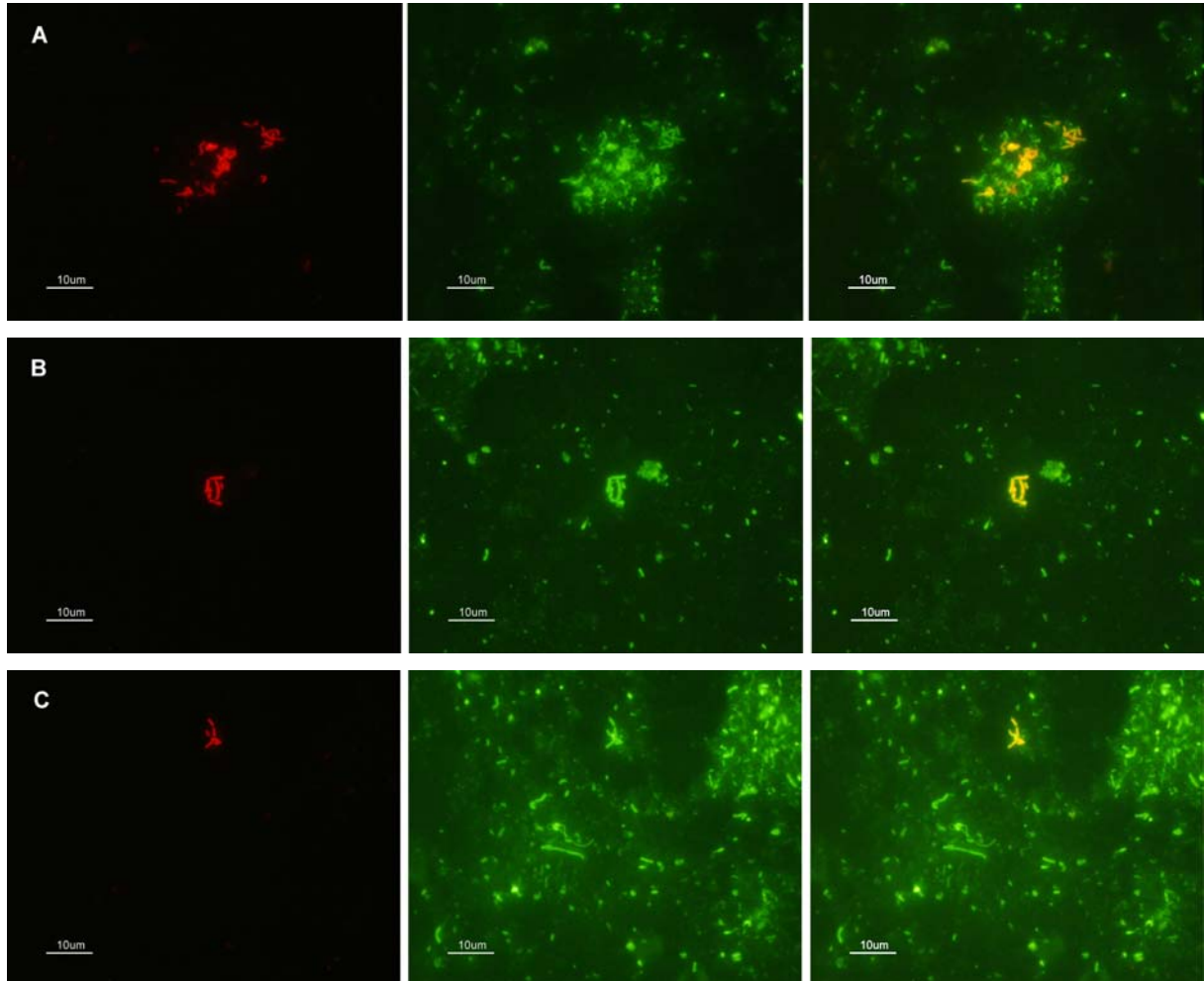


**Figure 31 : Aspects des biofilms hybridés à partir de J88. Ligne A : hybridation du biofilm eau chaude prélevé à J88 avec la sonde EUB338. B, C et D : aspect en syto-9 des biofilms prélevés en eau chaude à J122, J212 et J303. E, F et G : aspect en syto-9 des biofilms prélevés en eau froide à J122, J212 et J303.**

### II-3.2.2. Sonde LEGPNE1

L'hybridation avec la sonde spécifique a permis d'observer *L. pneumophila* dans les biofilms issus du réseau d'eau chaude jusqu'à J60 (Fig. 32). Les légionelles sont souvent regroupées, la plupart du temps en amas de moins de dix individus

(Fig. 32 B et C), beaucoup plus rarement en amas comptant plusieurs dizaines d'individus (Fig. 32A). Les prélèvements réalisés après J60 n'ont jamais permis d'obtenir un signal en hybridation.



**Figure 32 : Aspect des biofilms provenant du réseau d'eau chaude hybridés avec la sonde LEGPNE1. Colonne de gauche : marquage par la sonde, colonne centrale : marquage syto-9, colonne de droite : superposition des deux marquages. A : biofilm prélevé à J0, B et C : biofilms prélevés à J27.**

Dans le cas de l'hybridation avec les biofilms provenant de l'eau froide nous n'avons pu observer un signal significatif que sur le prélèvement réalisé à J27. Il semblerait que les légionelles hybridées soient à l'intérieur d'une cellule protozoaire (Fig. 33). La fluorescence conférée par la sonde est intense, signe d'une activité métabolique élevée (nombre de ribosomes élevé) qui peut être due à une multiplication active des bactéries.

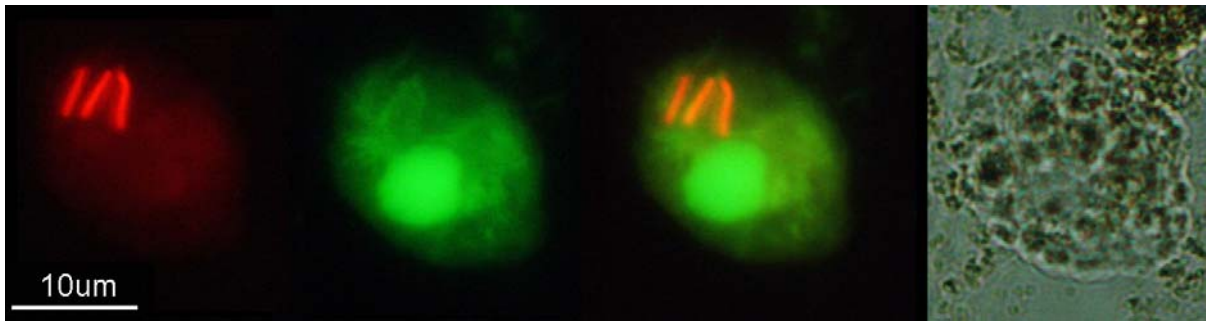


Figure 33 : Signal positif obtenu après hybridation du biofilm eau froide prélevé à J27 avec la sonde LEGPNE1. A droite : observation en lumière transmise.

## II-4. DISCUSSION

### II-4.1. Comparaison des techniques de détection

Les biofilms présents à la surface des canalisations de réseaux d'eau potable sont souvent considérés comme des réservoirs potentiels de micro-organismes pathogènes, notamment de légionelles. Plusieurs études font état d'une concentration plus importante de *L. pneumophila* dans les biofilms que dans l'eau circulante et recommandent donc un échantillonnage systématique de ces biofilms lors de la surveillance des réseaux (Wright *et al.* 1989; Ta *et al.* 1995). La technique de détection classique de ces bactéries par culture sur gélose étant longue et limitée par un certain nombre de facteurs (bactéries à l'état viable mais non cultivable), nous avons testé une méthode alternative de détection : la FISH, afin d'évaluer sa sensibilité et sa spécificité dans le cadre de la surveillance de la contamination des biofilms. La technique FISH est facile à mettre en œuvre et le résultat peut être obtenu dans la journée. Manz *et al.* décrivent son utilisation dans le cas de biofilms artificiels dopés avec des légionelles cultivées sur géloses (Manz *et al.* 1995), tandis que dans d'autres études elle a été appliquée sur des biofilms complexes cultivés en laboratoire (Williams *et al.* 2003) ou échantillonnés directement dans les réseaux (Kalmbach *et al.* 1997; Schwartz *et al.* 1998). En comparaison avec les nombreuses techniques de PCR disponibles pour la détection spécifique des légionelles (Herpers *et al.* 2003; Levi *et al.* 2003), la FISH a l'avantage théorique de permettre d'évaluer l'activité métabolique, donc la viabilité des bactéries en fonction de l'intensité de la



fluorescence observée (Poulsen *et al.* 1993; Moller *et al.* 1996). C'est un point important car les traitements de désinfection, même s'ils permettent de tuer les bactéries pathogènes, n'éliminent pas obligatoirement l'ADN de ces bactéries : (Tison *et al.* 1983) ont démontré l'omniprésence de *L. pneumophila* non viables dans toute la chaîne de production d'eau potable. Les techniques de PCR basées sur l'ADN ne sont donc pas adaptées, d'autant plus que les kits d'extraction de l'ADN sont parfois eux aussi contaminés (van der Zee *et al.* 2002; Evans *et al.* 2003), conduisant à des résultats positifs avec les techniques très sensibles de PCR quantitative.

Les seuls travaux dans lesquels des exemples d'images obtenues en hybridation à partir d'échantillons complexes sont présentés sont ceux de Kalmbach *et al.* (1997) : bactéries intra-cellulaires hybridées avec LEG705, et ceux de Williams *et al.* (2003) : bactéries hybridées dans des biofilms avec les sondes Leg5 et Leg8 ciblant l'ARNr 16S. Dans ce dernier cas, les images présentées ne nous paraissent pas très significatives dans la mesure où la superposition des champs visualisés en marquage universel (DAPI) avec ceux visualisés en marquage sondes (rhodamine) est mauvaise (Fig. 34). Les spots observés en marquage sonde peuvent être dus à une précipitation des fluorochromes, telle que nous avons pu l'observer à plusieurs reprises sur nos échantillons. Par ailleurs, les auteurs n'ont pas utilisé de témoin négatif qui aurait pu lever ce doute.

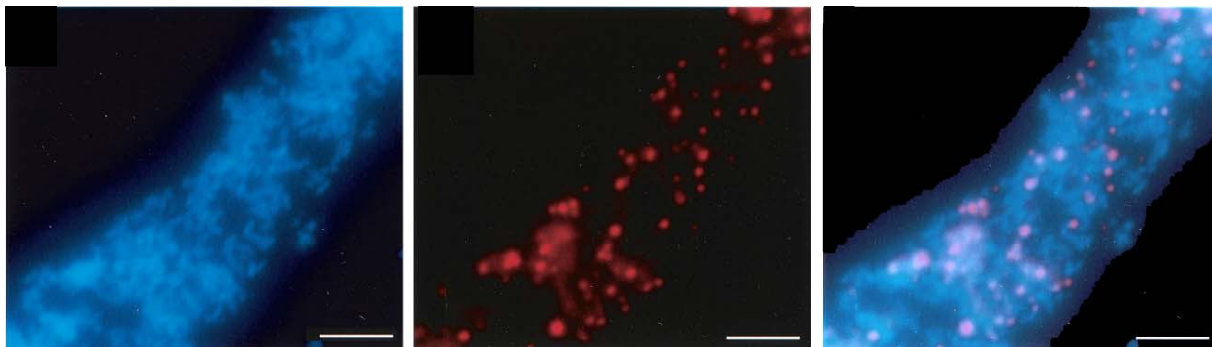


Figure 34 : Montage réalisé à partir des images présentées dans les travaux de Williams *et al.* 2003. A gauche : biofilm marqué au DAPI, au centre : marquage sonde Leg, à droite : superposition des deux marquages. Barre : 5  $\mu$ m.

Ces travaux, ainsi que ceux rapportés dans ce mémoire, nous permettent d'avancer un certain nombre d'arguments défavorables à l'utilisation de la FISH directement sur biofilms fixés pour la surveillance de la contamination des réseaux :

#### II-4.1.1. Limite de détection

La nécessité de réaliser une observation microscopique des échantillons hybridés induit une limite de détection élevée. L'utilisation du grossissement maximum (objectif 100) est nécessaire afin de s'assurer que les éléments fluorescents présentent bien une morphologie de bactéries. Dans nos expériences, la contamination théorique minimum nécessaire pour pouvoir observer au moins une bactérie hybridée par champ est d'environ 20 000 bactéries / cm<sup>2</sup>. Bien que l'observation de nombreux champs soit possible, il semble nécessaire qu'une bactérie au moins soit présente tous les 10 champs (2000 bactéries / cm<sup>2</sup> dans l'échantillon de départ) afin de permettre un traitement des résultats. Par comparaison, l'ensemencement direct sur gélose présente une limite de détection théorique de 0,5 bactéries / cm<sup>2</sup>.

#### II-4.1.2. Impact du cycle de développement intra-cellulaire de *L. pneumophila* sur la détection en FISH ?

Une des raisons qui peut être avancée pour expliquer à la fois la diminution du nombre de bactéries marquées en syto-9, la disparition du signal avec LEGPNE1 et paradoxalement une ré-augmentation des quantités de *L. pneumophila* détectées par culture est la présence en proportions importantes de cette espèce dans le biofilm restant, mais dans un état ne permettant pas sa détection en FISH tandis que la cultivabilité est conservée. Cette particularité pourrait s'expliquer par le cycle de développement intra-cellulaire de *L. pneumophila*, présumé être le seul moyen pour cette espèce de se multiplier dans l'eau potable (Murga *et al.* 2001). Il comprend de nombreuses étapes au cours desquelles *L. pneumophila* présente différents phénotypes.

En fin de répllication les bactéries se différencient en formes intra-cellulaires matures qui présentent des caractéristiques particulières : bactéries courtes, ramassées, dont la membrane externe présente une structure dense en microscopie électronique, elles sont résistantes à la lyse par les détergents, présentent une activité métabolique réduite mais possèdent des réserves nutritionnelles abondantes sous forme d'inclusions intra-cytoplasmiques de granules de poly-hydroxybutyrate (Garduno *et al.* 2002). Ces caractéristiques sont *a priori* peu favorables à une détection en FISH : de nombreux auteurs ont montré que des bactéries stressées,

dont l'activité métabolique est faible, présentent une quantité d'ARNr réduite et que dans ce cas la quantité de sondes hybridées par cellule est diminuée (Tolker-Nielsen *et al.* 1997). Par ailleurs la structure de la membrane externe est peut-être défavorable à une perméabilisation suffisante pour permettre la pénétration des sondes. En revanche la cultivabilité semble pouvoir être conservée longtemps : des études ont montré qu'elle est corrélée avec la présence des inclusions de poly-hydroxybutyrate, et que 25% des légionelles issues d'une culture sur gélose et incubées dans de l'eau du robinet stérile sont encore cultivables après 280 jours d'incubation (James *et al.* 1999). Des tests d'hybridation sur bactéries fixées à différentes étapes de leur développement intra-cellulaire, couplés à une mesure fine de l'intensité de la fluorescence grâce à un cytomètre en flux pourraient s'avérer utiles pour tester cette hypothèse.

#### II-4.1.3. Traitement des biofilms et impact sur la détection

L'éloignement physique entre le lieu d'implantation des systèmes de prélèvement et le lieu de l'analyse a imposé un délai de 24 h entre le prélèvement et l'analyse. Ces situations sont rencontrées par les laboratoires industriels qui effectuent l'analyse de prélèvements de provenances variées. Tous les échantillons ont été transportés à +4°C, et les biofilms ont été traités de 3 façons différentes : fixation en PFA 4% pendant le transport, fixation 3 heures en PFA 4% à l'arrivée au laboratoire, ou revivification de la flore au laboratoire suivie d'une fixation 3 h en PFA 4%. Les échantillons revivifiés ont toujours présenté l'intensité de fluorescence la plus importante après hybridation, c'est donc sur ces échantillons que nous avons travaillé par la suite. La technique de revivification utilisée n'est pas spécifique des légionelles car nous avons initialement pour objectif de réaliser aussi une caractérisation de la flore microbienne totale grâce aux sondes décrites dans l'étude des traitements de désinfection. Le faible nombre de cellules marquées et la qualité des images obtenues en microscopie à épifluorescence n'ont pas permis cette caractérisation. La revivification spécifique des légionelles issues de prélèvements d'eau de réseaux par incubation de la membrane de filtration 16 h sur gélose BCYE a été décrite par (Wullings *et al.* 2002), et permet d'augmenter significativement le nombre d'échantillons positifs lors de la détection par FISH. L'application de cette



technique spécifique aurait peut-être permis de détecter des légionelles dans les échantillons négatifs en FISH et positifs en culture à partir de J150.

Dans les amibes, *L. pneumophila* présente aussi une phase de multiplication active durant laquelle l'activité métabolique est élevée, elle est alors détectable avec des sondes spécifiques (Grimm *et al.* 2001). Ceci pourrait expliquer l'observation faite par Kalmbach *et al.* : lors d'hybridations sur biofilms préservés (coupons) avec la sonde LEG705, la majorité des bactéries détectées étaient intra-amibiennes, tandis qu'elles étaient rarement détectées à l'état libre. Dans notre étude, si des amibes contenant des *L. pneumophila* en phase de réplication active étaient présentes sur les billes de verre au moment du prélèvement, elles ont pu réagir de plusieurs façons en fonction des traitements appliqués : enkystement ou non lors du transport à +4°C, suivi ou non d'un désenkystement lors de l'incubation 16 h à 30°C. Si des trophozoïtes infectés étaient présents aux étapes de sonication et de vortex des biofilms il est probable qu'ils ont été lysés car ils sont relativement fragiles (Boulangier *et al.* 1995). Dans ce cas des légionelles présentant une activité métabolique élevée ont été libérées et fixées en PFA, rendant la détection par FISH possible. Le fait que les légionelles hybridées que nous avons pu observer étaient toujours regroupées en amas est compatible avec cette hypothèse : il peut s'agir de légionelles libérées à partir d'un même trophozoïte, suite à l'éclatement de la cellule ou à la sécrétion de vésicules remplies de légionelles (Berk *et al.* 1998). L'observation de ces amas de *L. pneumophila* extra-cellulaires hybridées avec la sonde LEG705 a déjà été rapporté (Desai *et al.* 1999). En revanche les kystes sont résistants à la sonication et l'hybridation de bactéries intra-kystes est impossible car les sondes ne pénètrent pas : si de telles formes étaient présentes et infectées par des légionelles dans nos échantillons au moment de la fixation en PFA nous ne les avons sans doute pas détectées.

## **II-4.2. Intérêt des incubateurs à biofilms pour la détection de *L. pneumophila* par culture**

### **II-4.2.1. Typage**

Le typage nécessite l'isolement et la culture des bactéries sur gélose. Les résultats obtenus en typage moléculaire démontrent que pendant toute la durée de

l'étude, et avec le pouvoir résolutif de la méthode utilisée, une seule souche a été isolée par culture sur gélose à partir des biofilms et des prélèvements d'eau. Cette souche a été retrouvée dans les biofilms en eau froide de manière peu fréquente, beaucoup plus fréquemment dans l'eau et les biofilms en eau chaude.

La persistance de une ou deux souches de *L. pneumophila* sur un même site pendant des périodes très longues a déjà été décrite. Dans une étude portant sur un réseau hospitalier de distribution d'eau potable, des auteurs ont réalisé le typage PFGE des souches isolées sur une période de 13 ans. Ils n'ont observé que trois pulsotypes différents, dont deux largement majoritaires mais qui n'étaient jamais retrouvés ensemble dans un même prélèvement (Rangel-Frausto *et al.* 1999). Les auteurs n'ont pas réussi à déterminer la cause de la persistance à très long terme de ces deux souches qui étaient aussi impliquées dans des cas d'infections nosocomiales. Dans d'autres cas il est rapporté la persistance dans un même réseau de souches présentant des pourcentages de similarité très proches : dans l'étude de (Perola *et al.* 2002) les souches isolées chez des patients et en différents points d'un réseau hospitalier appartiennent toutes au sérotype 5 et présentent 92% de similarité en typage moléculaire (AFLP et RAPD). D'autres études font état d'une diversité plus importante : Visca *et al.* ont identifié trois types différents de *L. pneumophila* sérotype 6 (typages PFGE et AFLP) isolées pendant une période de 8 ans dans un réseau hospitalier (Visca *et al.* 1999). Il semblerait donc que dans certains cas une souche particulière ou un groupe de souches très proches soit capable de coloniser durablement un réseau intérieur, sans que les causes de cet avantage écologique par rapport à d'autres souches soit connu : meilleure infectivité vis-à-vis des amibes, plus grande hydrophobicité, résistance aux traitements de désinfection peuvent être impliquées.

#### II-4.2.2. Contamination du réseau

Les incubateurs à biofilms ont permis de détecter *L. pneumophila* dans le réseau d'eau froide par culture alors qu'elles n'ont jamais été détectées en phase planctonique. Il semblerait donc que ces dispositifs puissent améliorer la détection du pathogène dans ce type d'eau par la méthode AFNOR. Durant toute l'étude, la température de l'eau froide a toujours été juste égale ou inférieure à la température minimale rapportée comme nécessaire à la multiplication de *L. pneumophila* : 20°C, il

semble donc peu probable que la bactérie ait pu se multiplier dans ces biofilms. En revanche, l'incubateur a pu servir de niche pour le désenkystement et la multiplication d'amibes présentes dans le réseau de distribution, rendant ainsi les légionelles éventuellement présentes dans les kystes accessibles à la détection par culture. L'intérêt d'une période d'incubation permettant le désenkystement des amibes pour la détection des *L. pneumophila* a été démontré dans plusieurs études (Sanden *et al.* 1992; Bartie *et al.* 2003). Une analyse de la flore amibienne réalisée sur le premier prélèvement par un intervenant extérieur a permis de démontrer que des amibes des genres *Naegleria* et *Hartmannella* étaient présentes en faibles quantités dans l'eau froide en amont (*Naegleria*) et en aval (*Naegleria* et *Hartmannella*) de l'incubateur. La contamination de kystes du genre *Hartmannella* par des légionelles a été récemment démontrée (Greub *et al.* 2003), tandis qu'elle n'a jamais été mise en évidence dans des kystes du genre *Naegleria*. Le seul résultat positif en FISH sur cet incubateur l'a été avec un biofilm revivifié 16h à 30°C : cette période de revivification a peut-être permis l'amorçage d'une multiplication des légionelles intra-amibiennes et l'obtention d'un signal d'hybridation fort.

Concernant le réseau d'eau chaude, nous n'avons pu dénombrer des légionelles à partir de l'eau prélevée en amont de l'incubateur que pour 8 prélèvements sur les 14 réalisés. Une étude menée par Bentham sur la détection de *L. pneumophila* dans des tours aéro-réfrigérantes a consisté à prélever des échantillons d'eau deux fois par semaine pendant 16 semaines sur une trentaine de sites. L'auteur a démontré l'extrême variabilité des taux de contaminations, qui n'étaient plus corrélés sur un même site après une période de seulement deux semaines (Bentham 2000). Dans notre étude, au moins une des analyses réalisées soit sur le biofilm soit en aval de l'incubateur a toujours été positive, avec des taux de contamination en aval toujours importants sauf à J88. Lors du premier prélèvement des amibes appartenant aux genres *Naegleria* et *Hartmannella* ont aussi été retrouvées, en quantités plus importantes que dans l'eau froide mais en aval de l'incubateur uniquement : il semble donc encore plus probable dans ce cas que l'incubateur amplifie la quantité d'amibes en concentrant sur une distance limitée une surface importante de biofilm. La température étant dans ce cas favorable, les amibes servent de support à la multiplication des légionelles et il se produit donc une amplification de la quantité de légionelles en sortie d'incubateur. Les résultats des

dénombrements dans l'eau et sur les biofilms des billes ne sont pas directement comparables : le fait que les prélèvements d'eau réalisés en aval soient très contaminés alors que les biofilms ne le sont pas à J241, J275 et J303 peut être du au développement d'un biofilm différent, plus riche en *L. pneumophila* et / ou en amibes sur d'autres parties de l'incubateur. Plusieurs études comparant différents types de matériaux pour leur capacité à servir de support de développement aux biofilms classent systématiquement le verre dans la catégorie "peu colonisé" comparativement au PVC, à différents alliages métalliques ou à certains élastomères (Rogers *et al.* 1994b; van der Kooij *et al.* 2002). Il se peut donc que la majorité de l'amplification n'ait pas lieu au niveau des billes de verre mais plutôt sur les surfaces en PVC ou sur les tuyaux d'évacuation.

## II-5. CONCLUSION

Les incubateurs à billes de verre ont permis l'amplification de la quantité de légionelles et la détection à partir des biofilms en eau froide alors que le dénombrement à partir de l'eau était négatif. Les colonies isolées sont constituées de la même souche (dans la limite des techniques de typage mises en œuvre) que celle isolée en eau chaude, l'hypothèse d'une contamination du réseau intérieur par l'eau distribuée est donc plausible. Dans l'eau chaude, l'incubateur permet une stabilisation de la population de légionelles et une détection plus homogène d'un prélèvement à l'autre.

La pertinence d'une utilisation de la technique FISH comme outil de détection de *L. pneumophila* dans les biofilms des réseaux intérieurs de distribution d'eau potable a été évaluée. Les seules légionelles hybridées observées dans les biofilms à l'état libre (hors protozoaires) l'ont été lorsque les biofilms étaient fortement contaminés. Bien que le résultat de l'analyse puisse être obtenu rapidement (en théorie dans la journée), la limite de détection est élevée.

### III- REIMPLANTATION DE LA SOUCHE ISOLEE A PARTIR DES INCUBATEURS DANS DES BIOFILMS ARTIFICIELS

Afin de tester la capacité de *L. pneumophila* à se multiplier dans les réseaux en l'absence de protozoaires, des biofilms constitués d'espèces bactériennes "potentialisatrices" ont été cultivés sur coupons de silicone et la souche de *L. pneumophila* isolée dans le réseau a été inoculée.

#### III-1. COLONISATION PRELIMINAIRE DES COUPONS

Les souches utilisées montrent une grande capacité à coloniser les surfaces. L'observation en microscopie confocale après coloration au syto-9 des biofilms prélevés juste avant l'inoculation de *L. pneumophila* révèle des aspects relativement différents (Fig. 35). *B. vesicularis* forme des amas de micro-colonies d'aspect étoilé entre lesquels sont dispersées des bactéries isolées. *E. brevis* forme des biofilms relativement peu denses composés de cellules individualisées tandis que *P. aeruginosa* forme des biofilms très denses constitués de nombreuses cellules.

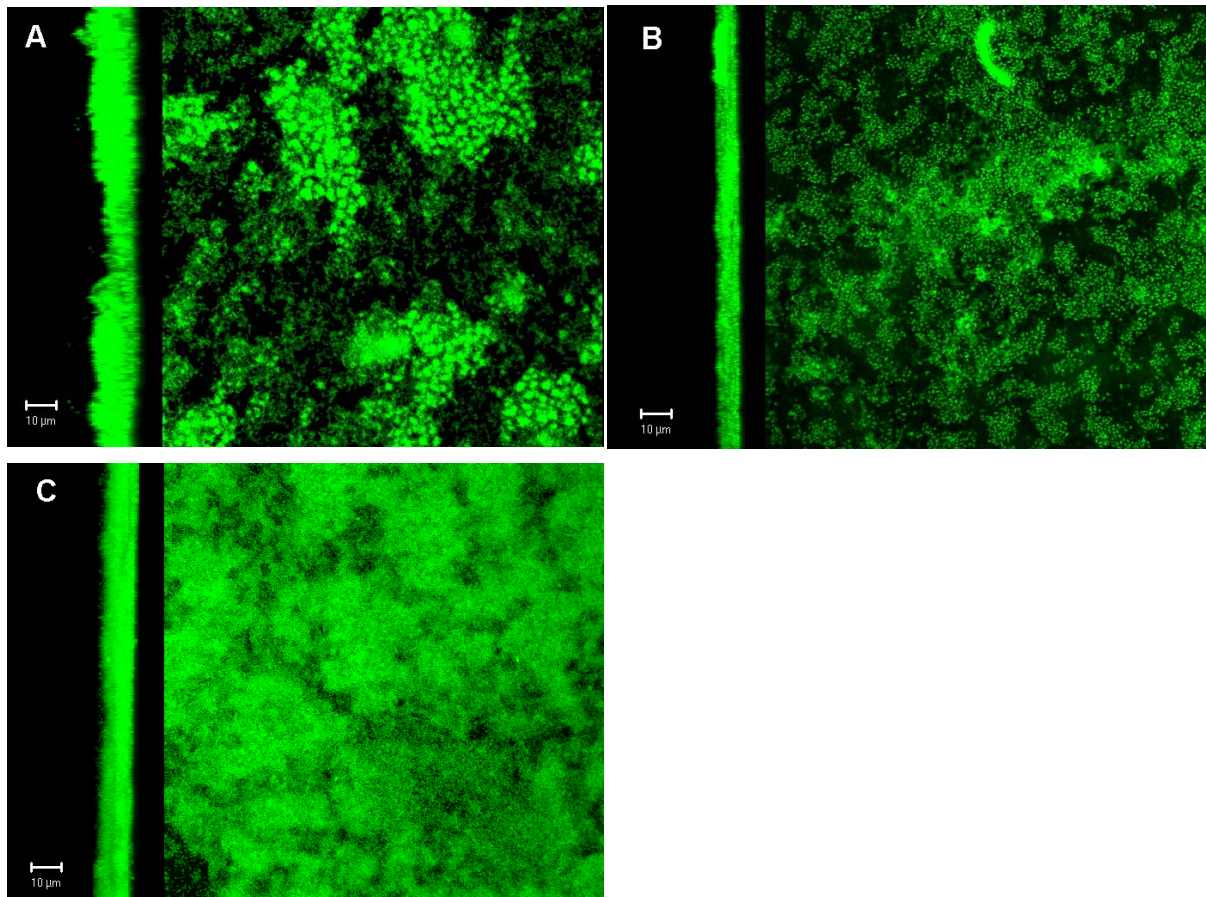


Figure 35 : Aspect des biofilms sur coupons de silicone observés en microscopie confocale après coloration syto-9 juste avant l'inoculation de *L. pneumophila*. A : *B. vesicularis*, B : *E. brevis* et C : *P. aeruginosa*.

## III-2. SUIVI DE L'EVOLUTION DE LA FLORE APRES INOCULATION DE *L. PNEUMOPHILA*

### III-2.1. Dénombrements sur géloses

#### III-2.1.1. Flore hétérotrophe

Les résultats des dénombrements de la flore hétérotrophe sur géloses R2A à 22°C à partir des biofilms et de la phase planctonique sont reportés ci-dessous :

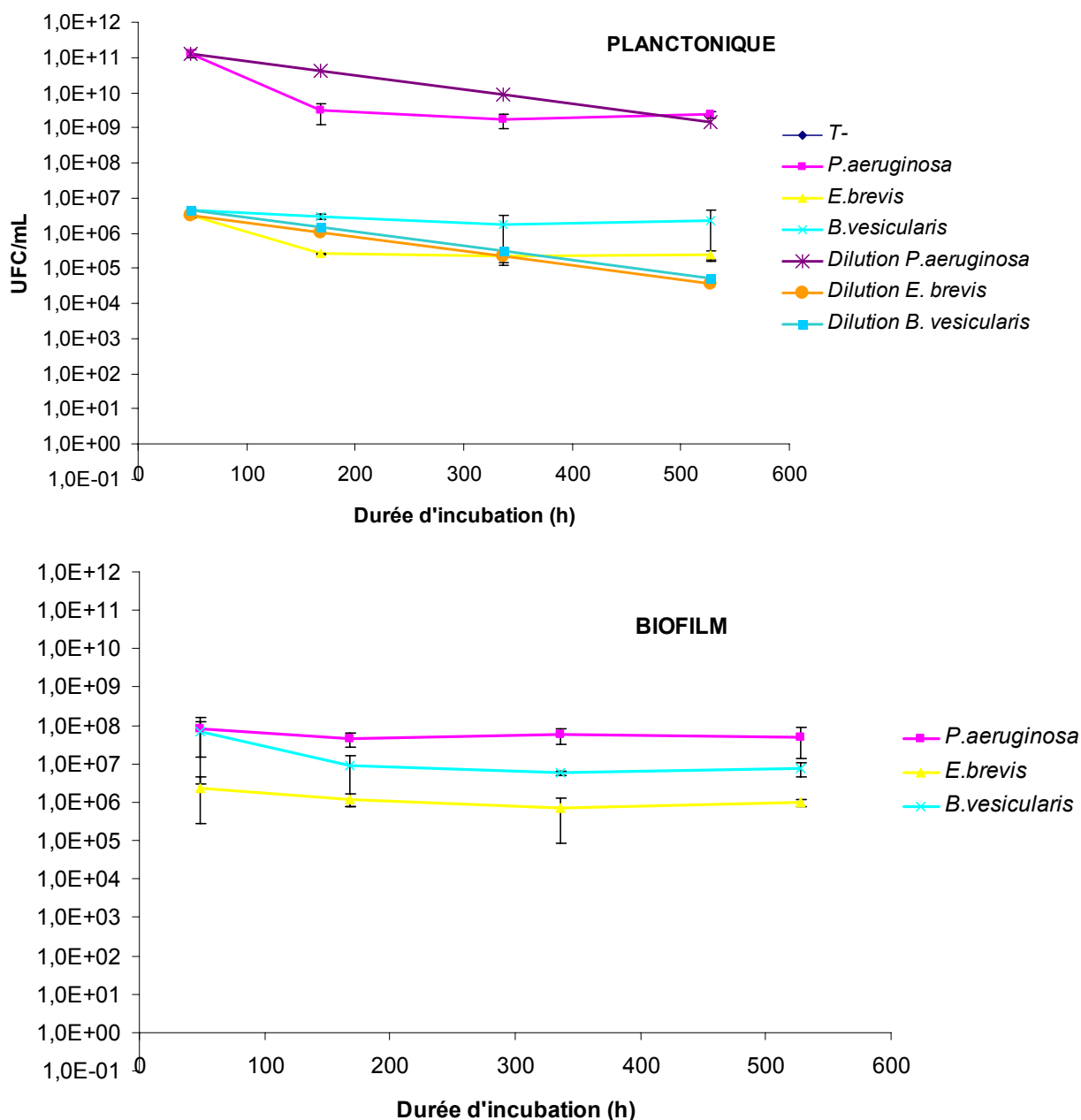


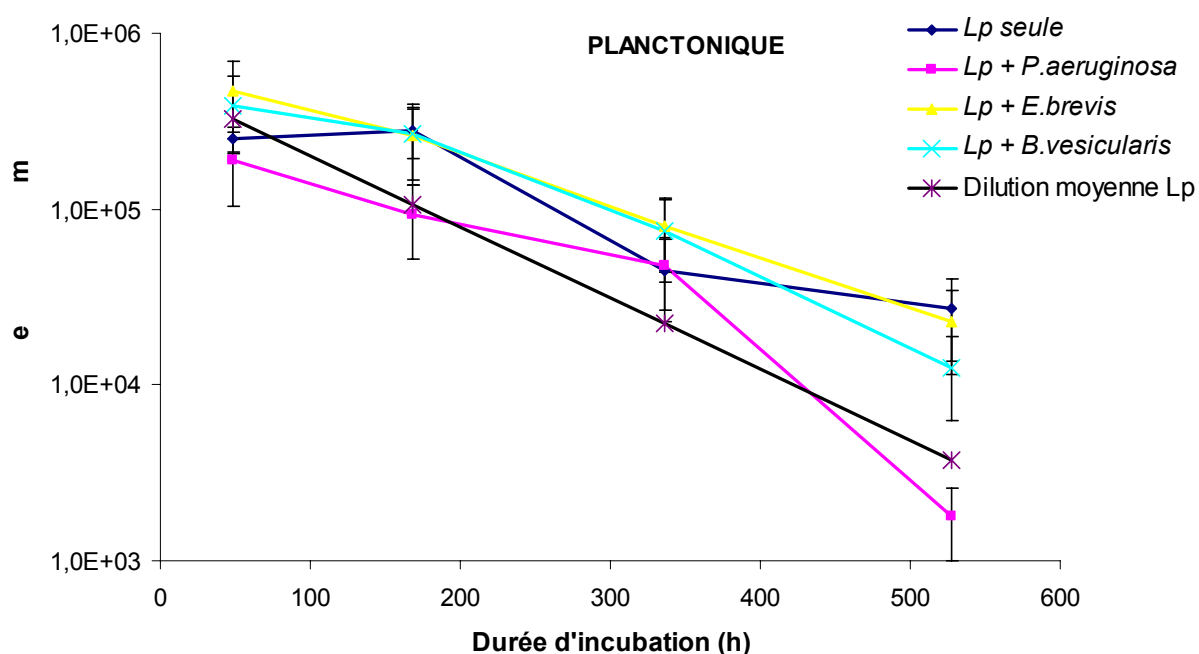
Figure 36 : Evolution des dénombrements sur R2A à partir de la phase planctonique et des biofilms prélevés à 48, 168, 336 et 528 h après inoculation de *L. pneumophila* (moyennes de 2 dénombrements, n=2 répétitions). La courbe de dilution théorique calculée à partir du premier dénombrement (48 h) est reportée pour la phase planctonique.

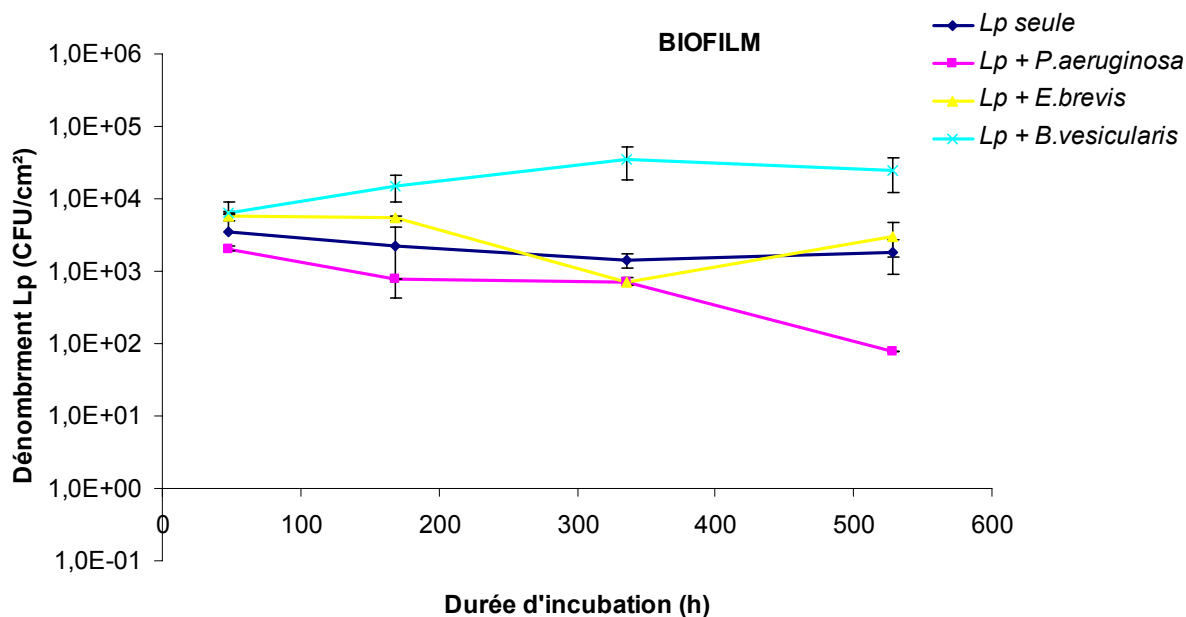
Les résultats correspondent aux observations réalisées en microscopie confocale : *P. aeruginosa* colonise les incubateurs à des taux nettement plus importants que les deux autres espèces. Il est intéressant de constater que cette différence est encore plus marquée sur les dénombrements réalisés en phase planctonique que sur ceux réalisés dans les biofilms. Cela peut être dû à un taux de croissance plus important des cellules planctoniques de *P. aeruginosa* dans l'eau de réseau additionnée de fer comparativement aux deux autres espèces, ainsi qu'à un réensemencement plus important de la phase planctonique à partir du biofilm.

Pour les trois espèces une baisse des taux de contamination de la phase planctonique est observée entre les dénombrements réalisés à 48 h et ceux réalisés à 168 h. Cette diminution est due à l'effet de la dilution dans le cas de *B. vesicularis*, tandis que pour les deux autres espèces la diminution est trop importante pour n'être attribuée qu'à la dilution : il y a sans doute une adaptation au milieu, se traduisant par une diminution importante des bactéries cultivables. Par la suite les dénombrements restent stables pour les trois espèces entre 336 et 528 h.

### III-2.1.2. *L. pneumophila*

Les résultats des dénombrements sur géloses de *L. pneumophila* dans les biofilms et en phase planctonique sont reportés ci-dessous :





**Figure 37 : Evolution des quantités de *L. pneumophila* dénombrées sur GVPC à partir de la phase planctonique et des biofilms prélevés à 48, 168, 336 et 528 h après inoculation (moyennes de 2 dénombrements, n=2 répétitions). La courbe de dilution théorique calculée à partir de la moyenne des premiers dénombrements de *L. pneumophila* (48 h) est reportée pour la phase planctonique.**

La dilution due au renouvellement quotidien de 20% du milieu correspond approximativement à une dilution au 100<sup>ème</sup> après 3 semaines. Cependant la diminution de la quantité de *L. pneumophila* en phase planctonique correspond seulement à une dilution au 10<sup>ème</sup> (passage de 10<sup>5</sup> à 10<sup>4</sup> UFC/mL) pour tous les échantillons sauf pour *L. pneumophila + P. aeruginosa* (passage de 1,9.10<sup>5</sup> à 1,8.10<sup>3</sup> UFC/mL). Il paraît peu probable qu'une croissance de *L. pneumophila* puisse être à l'origine de cet écart puisqu'il est aussi observé dans le cas de la bactérie seule et que la croissance de *L. pneumophila* dans ces conditions n'a jamais été mise en évidence dans la littérature. En revanche, il est possible que des bactéries relarguées à partir des biofilms formés sur le coupon de silicone, les parois en verre du flacon et le revêtement en Téflon du barreau magnétique, soient prises en compte dans le dénombrement planctonique.

Les dénombrements réalisés à partir des biofilms sur silicone sont restés relativement stables durant les 3 semaines : env. 10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup> pour *L. pneumophila + B. vesicularis*, 10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup> pour *L. pneumophila* seule ou co-incubée avec *E. brevis*. De même que dans le cas des bactéries en phase planctonique, une diminution de 2,0.10<sup>3</sup> à 7,7.10<sup>1</sup> UFC/cm<sup>2</sup> est observée dans le cas de la co-incubation avec *P. aeruginosa*.



### III-2.2. FISH

Les observations réalisées en FISH n'ont jamais permis de visualiser *L. pneumophila* dans les biofilms mixtes. Les seuls signaux détectés dans la zone de ré-émission du fluorochrome correspondent à des particules auto-fluorescentes (Fig. 38). Du fait de l'utilisation d'un objectif de grossissement 63x, la limite de détection théorique est réduite à environ 500 bactéries/cm<sup>2</sup>. Dans le cas de *L. pneumophila* seule marquée en syto-9 nous avons pu vérifier cette valeur : présence dans la plupart des champs de quelques bactéries faiblement marquées, bien individualisées, mais aucun signal n'est détecté avec les sondes LEG705 ou EUB338.

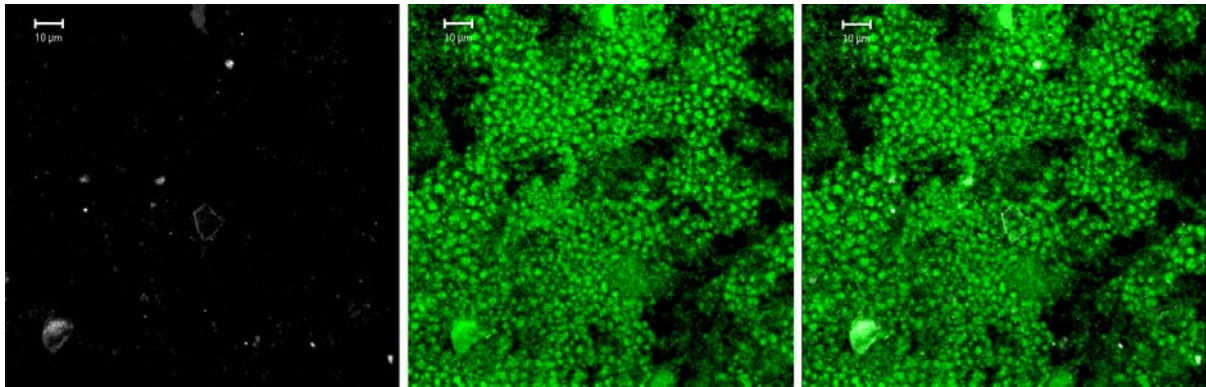


Figure 38 : Hybridation du biofilm *B. vesicularis* + *L. pneumophila* après 48 h d'incubation. A gauche : champ correspondant au marquage par la sonde LEG705, au centre : marquage syto-9, à droite : superposition des deux marquages.

### III-3. DISCUSSION

Plusieurs études ont tenté de montrer la capacité de *L. pneumophila* à se multiplier dans les biofilms en l'absence d'hôte protozoaire. Murga *et al.* (2001) ont inoculé un réacteur à biofilm comprenant les espèces *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *Flavobacterium* sp. avec une souche de *L. pneumophila* et ont observé que, bien que capable de persister dans le biofilm, elle était incapable de se multiplier en l'absence de protozoaire. Cette étude est critiquable car les espèces constitutives du biofilm de base ne sont pas forcément "potentialisatrices" de *L. pneumophila*. (Surman *et al.* 1999) ont démontré que *L. pneumophila* inoculée dans un biofilm complexe constitué à partir d'un consortium prélevé dans un réseau est capable de

se multiplier en l'absence de protozoaire. Les espèces identifiées par culture à partir du biofilm utilisé comprenaient notamment *Brevundimonas vesicularis* et un *Flavobacterium* sp., espèces par ailleurs décrites comme permettant une croissance satellitaire de *L. pneumophila* sur gélose BCYE sans cystéine (Wadowsky *et al.* 1983; Koide *et al.* 1989).

Dans nos travaux, nous avons voulu répéter l'expérience de Murga *et al.* mais en utilisant les deux espèces "potentialisatrices" de *L. pneumophila* comme base du biofilm. Un biofilm constitué de *P. aeruginosa* a servi de contrôle dans lequel *a priori* aucune croissance de *L. pneumophila* ne devait être détectée. Des biofilms ont donc d'abord été constitués en utilisant un milieu nutritif, puis ce milieu a été remplacé par de l'eau issue du réseau sur lequel étaient implantés les incubateurs. Cette eau a été préalablement stérilisée par filtration et supplémentée en fer à la même concentration que celle utilisée dans le BCYE, afin que l'apport en cet élément essentiel ne constitue pas un facteur limitant. En effet les phénomènes de corrosion fréquemment décrits dans les réseaux font que le fer est souvent disponible en quantités suffisantes pour permettre la croissance de *L. pneumophila* (States *et al.* 1985). La souche de *L. pneumophila* isolée dans le réseau a ensuite été inoculée et son évolution dans la phase planctonique et dans les biofilm a été suivie par culture sur gélose GVPC et FISH.

Les différences de taux de colonisation observées par culture sur gélose ne permettent pas de conclure quant à l'existence ou non d'une multiplication de *L. pneumophila*. S'il y a effectivement multiplication, comme cela semblerait pouvoir être le cas avec *B. vesicularis*, elle est trop faible pour pouvoir être mise en évidence par culture. Nous avons utilisé la FISH dans le but d'observer directement *L. pneumophila* dans les biofilms, et éventuellement de mettre en évidence la formation de microcolonies. L'observation de telles structures dans un biofilm dépourvu de protozoaires tendrait en effet à prouver l'existence d'une multiplication locale, même réduite. Elles ont été décrites dans des biofilms poly-microbiens par certains auteurs mais les méthodes utilisées étaient relativement peu spécifiques : microscopie électronique à balayage (Wright *et al.* 1989) et marquage avec des anticorps (Rogers *et al.* 1992). Par ailleurs dans ces études l'absence de protozoaires n'était pas garantie. Dans notre étude, la FISH s'est révélée inefficace pour visualiser *L. pneumophila*, pourtant détectée par culture dans des quantités compatibles avec une

visualisation aisée dans le cas du biofilm constitué de *B. vesicularis* ( $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> correspondant env. à une vingtaine de cellules par champ). Le fait que le marquage par les deux sondes LEG705 et EUB338 soit inefficace sur les biofilms constitués de *L. pneumophila* seule tend à prouver que les légionelles ne sont pas dans un état physiologique compatible avec une détection par ces outils. En revanche la cultivabilité est conservée : l'étude de James *et al.* décrit que 30% des légionelles cultivées sur gélose et incubées en eau du robinet sont encore cultivables après une semaine d'incubation, 25% après 280 jours et 10% après 380 jours, ceci malgré une activité métabolique très réduite (James *et al.* 1999).

### III-4. CONCLUSION

Cette étude ne permet pas de conclure quant à l'éventuelle croissance de *L. pneumophila* au sein des biofilms en l'absence d'hôte protozoaire. En revanche elle conforte les conclusions de l'étude réalisée avec les incubateurs à billes de verre : la FISH apparaît inadaptée pour la détection des légionelles directement dans les biofilms. Cette limitation peut être contournée en utilisant des bactéries modifiées par introduction du gène codant pour la GFP, permettant ainsi la visualisation directe dans le biofilm. Nous ne disposons pas encore de la souche fournie par M. Steinert lors de la réalisation de cette étude, par ailleurs la construction plasmidique utilisée dans ce cas est instable et a tendance à disparaître rapidement lors des divisions cellulaires (Kohler *et al.* 2000), elle n'aurait donc pas forcément été utilisable pour ces essais. L'utilisation de quelques espèces seulement comme base du biofilm limitant considérablement les possibilités d'interactions, une solution pourrait consister à reproduire des écosystèmes complexes sans protozoaires (filtration, utilisation de cycloheximide) et à y inoculer une souche de *L. pneumophila* marquée à la GFP.

# CHAPITRE III

## 2<sup>ème</sup> Partie

### Comparaison de l'Efficacité des Traitements de Désinfection

## I- CONTEXTE DE L'ETUDE

De nombreux traitements physiques et/ou chimiques destinés à prévenir et à contrôler la contamination des réseaux d'eau potable par *L. pneumophila* sont décrits dans la littérature (Kim *et al.* 2002; Campos *et al.* 2003). Malgré ces travaux, il n'existe pas de consensus clair quant au traitement le plus adapté. Ceci est du en partie à la variété des conditions expérimentales utilisées dans ces études.

Dans le cas des essais en laboratoire, les tests de désinfection ont été réalisés :

- sur des bactéries cultivées sur gélose et remises en suspension dans de l'eau distillée stérile stagnante (Miyamoto *et al.* 2000),
- sur des bactéries cultivées sur gélose et remises en suspension dans de l'eau de réseau stérile en circulation (Muraca *et al.* 1987),
- sur des circuits reproduisant un réseau de distribution colonisé avec une flore simplifiée avec (Donlan *et al.* 2002) ou sans (Walker *et al.* 1999) amibes et n'évaluant qu'un seul type de traitement.

Les études menées en conditions réelles sur réseaux sont nombreuses mais limitées à l'évaluation d'un ou deux traitements (Walker *et al.* 1995; Liu *et al.* 1998; Steinert *et al.* 1998; Lee *et al.* 2002; Srinivasan *et al.* 2003). Les résultats sont difficiles à comparer en raison de la grande variabilité des paramètres biologiques (populations microbiennes) et physico-chimiques (hydrodynamique, pH, température, matériaux, etc.). Par ailleurs les méthodes utilisées pour l'analyse des populations microbiologiques sont souvent différentes : culture, sondes, techniques de PCR, de clonage et typage, toutes ces méthodes introduisent des biais qui leur sont propres et qui rendent la comparaison quasi-impossible.

La biologie complexe de *L. pneumophila* accentue encore ces limites : les bactéries en suspension dans l'eau du réseau sont plus résistantes à l'action des désinfectants que les bactéries cultivées sur gélose (Kuchta *et al.* 1985), les bactéries nichées dans les biofilms sont plus résistantes que les bactéries planctoniques (Cargill *et al.* 1992) et les bactéries à l'intérieur de trophozoïtes ou de kystes amibiens sont encore plus résistantes (Kilvington *et al.* 1990). L'efficacité des

traitements de désinfection doit donc être comparée dans des conditions écologiques identiques.

Ce chapitre décrit les résultats obtenus lors de tests de désinfection réalisés sur un pilote reproduisant un réseau de distribution d'eau potable. Sept circuits identiques ont servi à comparer six traitements (+ témoin non traité) : le chlore, la monochloramine, le dioxyde de chlore, l'électro-chloration, l'ozone et l'ionisation cuivre/argent. Des méthodes classiques de culture sur gélose ainsi que des méthodes de marquage fluorescent couplé à une détection en microscopie confocale et à une analyse informatisée des images obtenues ont été utilisées pour suivre l'évolution de la composition de la flore et de l'architecture des biofilms durant les traitements.

## **II- ESSAIS DE COLONISATION D'UNE CANALISATION**

### **II-1. COLONISATION NATURELLE**

Les dénombrements réalisés en phase planctonique avant l'injection, à J14 et J64 après la mise en route du système, ont permis de dénombrer  $2 \cdot 10^5$  et  $10^4$  UFC/L d'une même souche de *L. pneumophila* séro groupe 2-14 (Fig.25, souche "Pilote"). L'unité était donc naturellement colonisée avant injection du mélange de souches, à partir de l'eau de Seine filtrée sur sable ou de l'eau du réseau de distribution.

### **II-2. INOCULATION DU MELANGE DE SOUCHES DE *L. PNEUMOPHILA***

La population totale de *L. pneumophila* a diminué de  $10^9$  UFC/L juste après l'injection à  $10^5$  UFC/L à la fin de l'expérimentation (Fig. 39). Parmi les 5 souches injectées, seule la souche "pilote" persistait après 1 mois, passant de 40% des colonies isolées à J1 à 100% à J28. Les 4 souches séro groupe 1 ont progressivement disparu. Une analyse des amibes mésophiles totales réalisée à J9 a permis de dénombrer  $2,8 \cdot 10^3$  amibes /L.

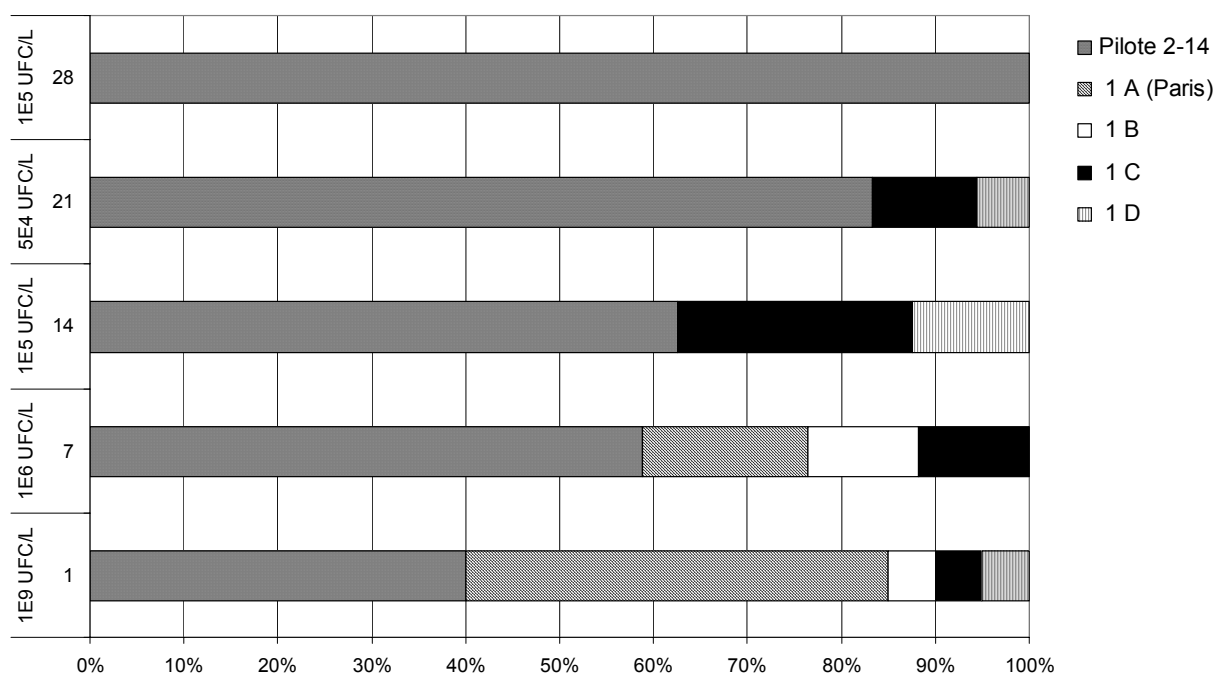


Figure 39 : Evolution des proportions des différentes souches isolées dans l'eau en sortie de canalisation. Sur l'axe des ordonnées figurent le dénombrement correspondant à chaque prélèvement (UFC/L) et la date de prélèvement (en jours après l'injection du mélange de souches).

### II-3. CONCLUSION

Cette étude préliminaire a permis de démontrer la faisabilité d'implanter durablement une souche de *L. pneumophila* dans une canalisation du même type que celles utilisées pour la construction de l'unité pilote. De la même manière que pour les incubateurs à billes de verre installés dans les réseaux, il semblerait qu'une fois implantée la souche occupe la niche écologique et prévienne ainsi l'installation d'autres souches. Dans cette expérience, la souche Paris récemment décrite comme étant impliquée dans 12,2% des cas de légionelloses en France (Aurell *et al.* 2003) n'a pas réussi à coloniser la canalisation occupée par la souche locale. Elle n'a donc pas exprimé un avantage écologique qui aurait pu lui permettre de déplacer la souche implantée.

### III- ESSAIS DE DESINFECTION SUR PILOTE

#### III-1. COLONISATION

##### III-1.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau alimentant le pilote

Les paramètres mesurés par le CIRSEE dans l'eau de réseau alimentant le pilote sont énumérés dans le tableau XII ci-dessous :

Tableau XII : caractéristiques physico-chimiques de l'eau alimentant le pilote (mesures CIRSEE)

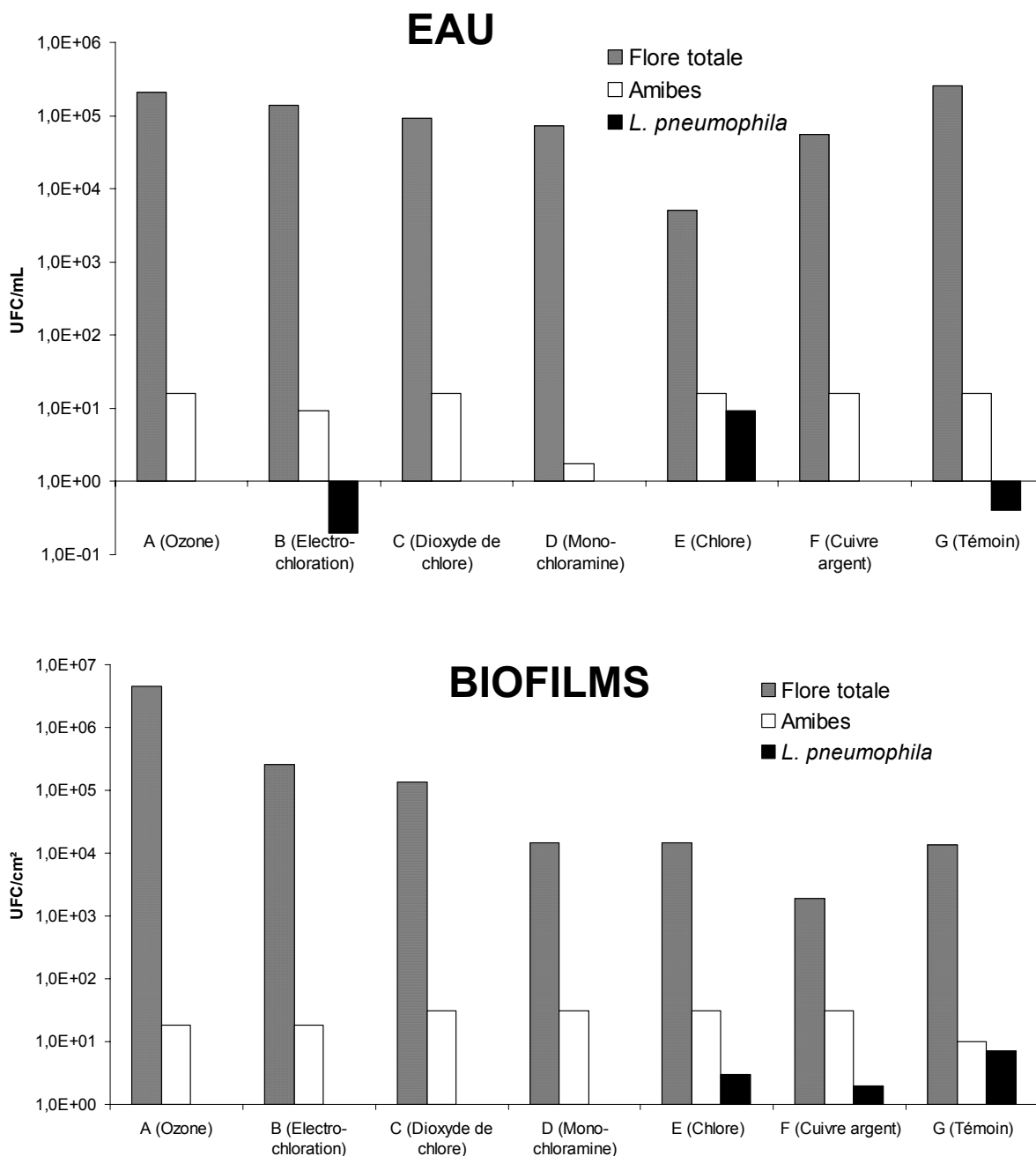
pH	7,6
Turbidité	0,08 NTU
COT	0,7 – 0,8 mg l <sup>-1</sup>
Oxygène dissous	8,60%
Saturation en oxygène	95%
Conductivité	598 µS cm <sup>-1</sup>
Dureté	21°f
Ca <sup>++</sup>	109,8 mg l <sup>-1</sup>
Cl <sup>-</sup>	32 mg l <sup>-1</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	69 mg l <sup>-1</sup>
Fer total	< 20 µg l <sup>-1</sup>
Cuivre	< 2 µg l <sup>-1</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	256 mg l <sup>-1</sup>

##### III-1.2. Implantation et stabilisation de la population de *L. pneumophila*

Cinq semaines après la mise en eau de l'unité pilote, une analyse de la population des biofilms sur billes de verre et dans l'eau circulante a été réalisée sur les 7 boucles en acier galvanisé (Fig. 40). Une seule et même souche de *L. pneumophila* séroroupe 1 a été retrouvée en faibles concentrations, dans les biofilms et dans l'eau pour les boucles G et E, dans le biofilm uniquement pour la boucle F, et dans l'eau uniquement pour la boucle B. Une variabilité importante de la flore totale cultivée sur R2A à partir des biofilms des différentes boucles a été observée, avec des taux de colonisation variant de  $1,9 \cdot 10^3$  à  $4,6 \cdot 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>



(moyenne :  $7,2 \cdot 10^5 \pm 1,6 \cdot 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>). En revanche les dénombrements en phase planctonique étaient plus homogènes, avec des taux de contamination compris entre  $5 \cdot 10^3$  et  $2,5 \cdot 10^5$  UFC/mL (moyenne :  $1,2 \cdot 10^5 \pm 8,2 \cdot 10^4$  UFC/mL). Les amibes étaient constamment retrouvées dans l'eau et dans les biofilms, à des niveaux de populations homogènes :  $2,4 \cdot 10^1 \pm 8,1$  UFC/mL et  $1,3 \cdot 10^1 \pm 5,2$  UFC/cm<sup>2</sup>.



**Figure 40 : Etat de la colonisation du pilote (boucles principales) cinq semaines après la mise en eau. Les différentes boucles sont désignées par des lettres, les traitements appliqués dans la suite de l'étude sont indiqués entre parenthèses.**

Neuf semaines après la mise en route du pilote, une analyse de la contamination en *L. pneumophila* de l'eau des 7 boucles principales a été réalisée. Des *L. pneumophila* séro-groupe 1 (test d'agglutination au latex) naturellement implantées ont été isolées dans toutes les boucles, à des taux variant de  $10^3$  à  $10^5$  UFC/L. Afin d'homogénéiser les taux de contamination dans les différentes boucles la souche isolée à la cinquième semaine a été cultivée sur gélose BCYE et réinjectée dans les boucles à J -85.

Un suivi régulier de la contamination de l'eau des boucles et des bras morts a ensuite été réalisé pendant 3 mois avant de démarrer les essais de désinfection. Durant cette période, les colonies isolées n'ont plus été typées que par test d'agglutination au latex, il s'agissait de *L. pneumophila* appartenant au séro-groupe 1. Immédiatement après l'inoculation, la contamination dans les boucles principales était de  $10^6$  à  $10^7$  UFC/L (Fig. 42), puis elle a progressivement diminué pour atteindre une valeur moyenne de  $1,05 \cdot 10^5$  UFC/L à J -43 et ré-augmenté entre  $10^5$  et  $10^7$  UFC/L pour la plupart des boucles juste avant traitement (sauf boucle G :  $5,5 \cdot 10^4$  UFC/L). L'eau des bras morts était généralement moins contaminée

### III-1.3. Flore du pilote avant traitement

Une évaluation complète de la flore planctonique et des biofilms dans le pilote a été réalisée 12 jours avant le début de la campagne de traitements. Cette évaluation a été réalisée dans les boucles et dans les bras morts. La flore planctonique a été dénombrée par culture, tandis que les biofilms ont été dénombrés par culture et analysés par marquage FISH et LIVE/DEAD.

#### III-1.3.1. Evaluation par culture

Les biofilms prélevés à partir des billes de verre placées dans les bras morts sont significativement (test de Student effectué sur les valeurs brutes,  $P < 0,05$ ) moins contaminés que ceux prélevés dans les boucles principales (Fig. 41). Concernant la phase planctonique, les légionelles sont moins nombreuses dans l'eau des bras morts, tandis que la flore totale et les amibes sont à des valeurs de contaminations semblables. Les amibes appartiennent aux genres *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Vahlkampfia*.

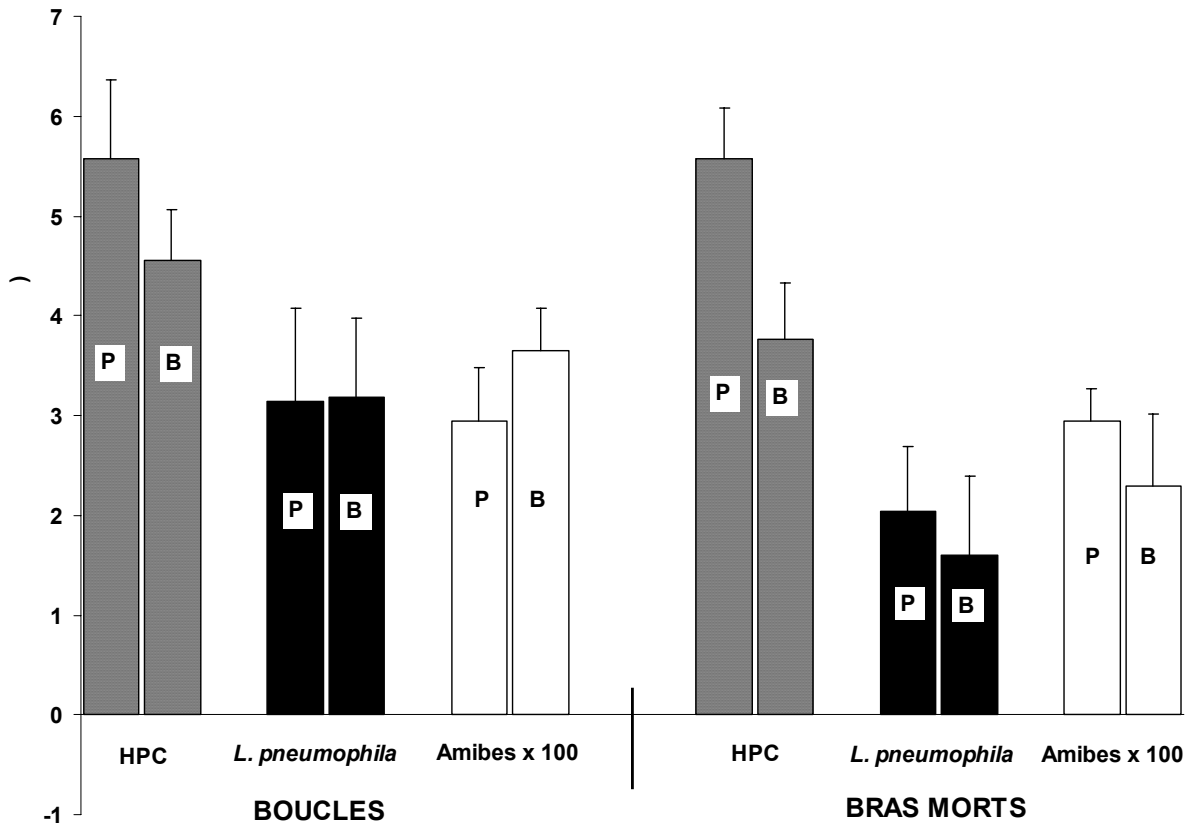


Figure 41 : Contamination du pilote 12 jours avant le début des traitements. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs sur les 7 circuits. La population planctonique (P) est indiquée en UFC/mL, la population des biofilms (B) en UFC/cm<sup>2</sup>. Les valeurs des taux de contamination par les amibes ont été multipliées par 100 afin de permettre une représentation aisée sur le même graphique.

### III-1.3.2. Evaluation par marquage LIVE/DEAD

Les valeurs d'épaisseur moyenne des biofilms et de biomasse totale calculées par Comstat étant relativement faibles, les résultats sont reportés en quantité de biomasse ( $\mu\text{m}^3$ ) par champ observé. Cette valeur est obtenue en multipliant la biomasse par unité de surface calculée par Comstat par la surface des champs observés. Le nombre minimum de cellules par champ nécessaire pour pouvoir effectuer une analyse étant approximativement de 500 cellules, la limite de détection de la technique se situe aux alentours de  $5 \cdot 10^2$  à  $5 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$  / champ.

#### III-1.3.2.a. Biofilms des boucles principales

L'épaisseur moyenne et la biomasse totale des biofilms provenant des boucles sont respectivement de  $2,9 \pm 1,0 \mu\text{m}$  et  $0,8 \pm 0,4 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ . La quantité de biomasse par champ observé varie de 1,3 à  $7,4 \cdot 10^4 \mu\text{m}^3$  (Fig. 48). La proportion de biomasse marquée par l'iodure de propidium (bactéries considérées mortes) dans ces biofilms

varie de 1,1 à 20,1%, avec une valeur moyenne à  $9,9 \pm 6,9\%$ . Les biofilms sont relativement homogènes : la biomasse est répartie de façon diffuse sur toute la surface des champs observés (Fig. 42A).

### III-1.3.2.b. Biofilms des bras morts

L'épaisseur moyenne est de  $2,3 \pm 1,2 \mu\text{m}$ , et la biomasse totale de  $0,5 \pm 0,3 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ , elles ne sont pas significativement différentes des valeurs observées dans les boucles. La quantité de biomasse par champ observé varie de  $4,0 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$  à  $1,9 \cdot 10^4 \mu\text{m}^3$  (Fig. 48). En revanche, la proportion de biomasse marquée par l'IP est plus importante ( $P < 0,005$ ) que dans les biofilms provenant des boucles, elle varie de 20,4 à 92,6%, avec une valeur moyenne à  $51,4 \pm 27,1\%$ . Le marquage LIVE/DEAD est donc très hétérogène, avec des biofilms marqués majoritairement par le syto-9 (Fig. 42B) ou majoritairement par l'IP (Fig. 42C).

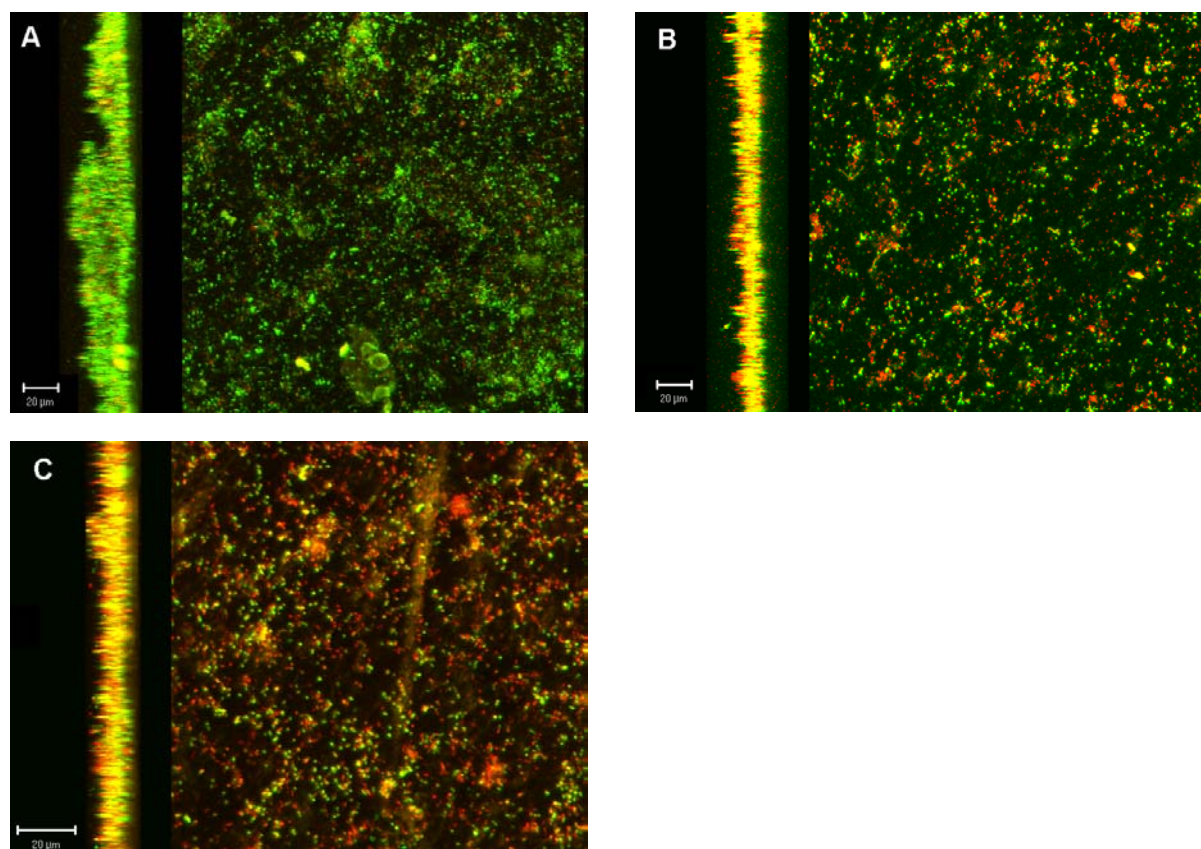


Figure 42 : Aspect des biofilms sur coupons PVC en marquage LIVE/DEAD avant démarrage des traitements. A : Biofilm provenant de la boucle témoin, B : biofilm provenant de la canalisation en cuivre du circuit destiné au traitement par le dioxyde de chlore, G : biofilm provenant de la canalisation en cuivre du circuit témoin. La différence d'échelle dans l'image C provient d'une différence de grossissement numérique qui a été prise en compte lors de l'analyse d'images.

### III-1.3.3. Evaluation par marquage FISH

#### III-1.3.3.a. Détermination du nombre de champs à analyser

La première étape de la mise en place d'une procédure d'analyse des images obtenues en FISH a consisté à déterminer le nombre de champs minimum à analyser afin d'obtenir des résultats de quantification fiables. Pour cela, la moyenne et les écarts types des ratios d'aires marquées par la sonde en fonction du nombre de champs analysés ont été calculés pour différents types d'échantillons (Fig. 43). Un nombre moyen de 12 champs analysés a été jugé satisfaisant puisque une stabilisation de la moyenne et de l'écart type est observée.

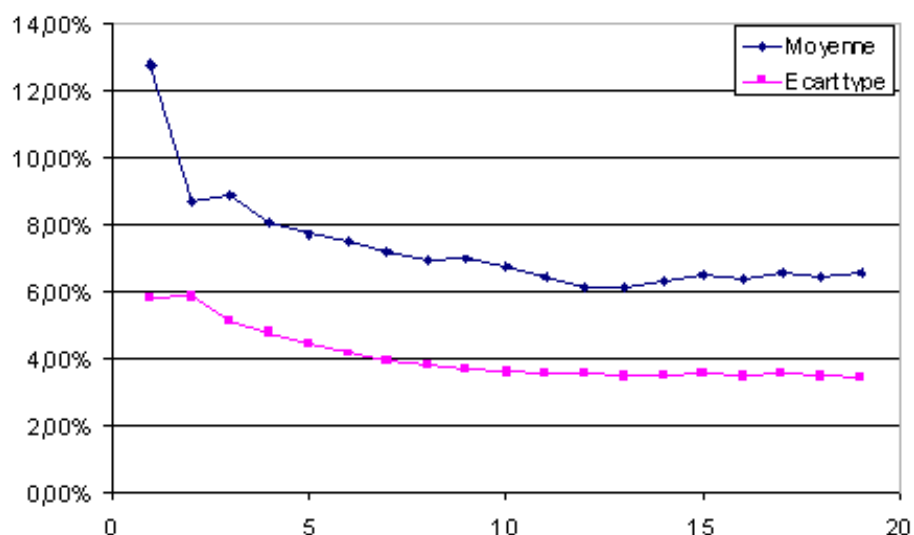


Figure 43 : Evolution de la moyenne et des écarts-types des proportions d'aires spécifiques à la sonde d'intérêt BET42a en fonction du nombre de champs analysés. Ratio d'aires exprimé par rapport à l'aire totale marquée par le syto-9.

#### III-1.3.3.b. Essais de dopage des biofilms

Afin de vérifier que la mauvaise détection des légionelles en FISH observée dans les études portant sur les incubateurs réseau n'était pas due au traitement spécifique appliqué à ces biofilms par rapport aux légionelles testées en culture pure, des tests de dopage de biofilm issu du pilote avec des *L. pneumophila* cultivées sur gélose BCYE ont été réalisés. Le biofilm a été prélevé à partir des billes de verre de la boucle A et une suspension de *L. pneumophila* (souche "Pilote") cultivée 5 jours sur gélose BCYE et diluée en PBS stérile a été ajoutée. Le traitement classique réservé aux biofilms a ensuite été appliqué, suivi d'une hybridation avec la sonde

LEG705. Le résultat obtenu (Fig. 44) démontre que la procédure n'affecte pas le marquage des légionelles : toutes les bactéries présentant une morphologie typique de *L. pneumophila* sont marquées par la sonde.

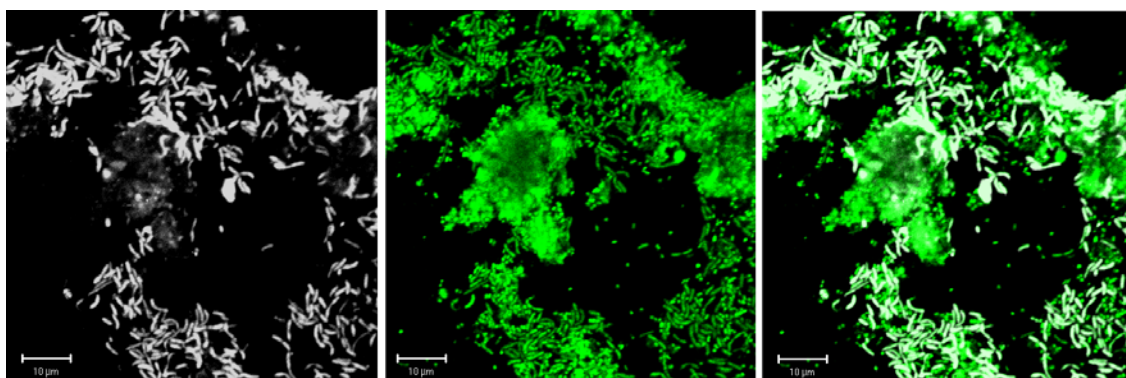


Figure 44 : Biofilm issu de la boucle A (avant traitement), dopé en *L. pneumophila* souche "pilote" et hybridé avec la sonde LEG705. A gauche : sonde, au centre : syto-9, à droite : superposition des deux marquages.

#### III-1.3.3.c. Composition des biofilms des boucles

Les résultats des calculs des proportions des différents groupes hybridés par les sondes sont indiqués dans le Tableau XIII. Les résultats obtenus sont relativement hétérogènes d'une boucle à une autre. La biomasse marquée par le mélange des trois sondes EUB varie entre 25 et 76% de la biomasse totale marquée par le syto-9, avec une valeur moyenne de  $45,5 \pm 19,3\%$ . La flore est essentiellement constituée de  $\beta$ -*Proteobacteria*, parfois associées à des  $\alpha$ - et  $\gamma$ -*Proteobacteria* (Fig. 42). Quelques bactéries marquées par la sonde SRB385 sont détectées dans les biofilms des boucles A (ozone), B (electro-chloration) et E (chlore). Aucune bactérie marquée par la sonde CF319a n'a été observée. Par ailleurs la perméabilisation au lysozyme n'a pas modifié significativement le pourcentage de la biomasse marquée par MixEUB338, et aucun signal n'a été détecté après hybridation avec les sondes MixLGC354 ou HGC69a, avec ou sans traitement de perméabilisation au lysozyme. Il semblerait donc que les bactéries Gram + soient absentes des biofilms étudiés, ou non détectables en FISH. L'addition des pourcentages des biomasses marquées par les sondes de groupes est comparable à la biomasse marquée par MixEUB338 dans le cas des boucles destinées aux traitements par l'électrochloration et le dioxyde de chlore, et dans le cas de la boucle témoin. En revanche ce n'est pas le cas dans les autres boucles, dans lesquelles un nombre important de micro-organismes non détectés par nos sondes pourrait donc être présent.

Quelques cellules à l'état libre marquées par la sonde LEG705 ont été détectées dans les biofilms contaminés avec au moins  $10^3$  *L. pneumophila* par  $\text{cm}^2$  (Fig. 45). Cependant ces cellules étaient en nombre trop faible pour que l'analyse d'image puisse les distinguer du bruit de fond obtenu après hybridation avec la sonde Non338.

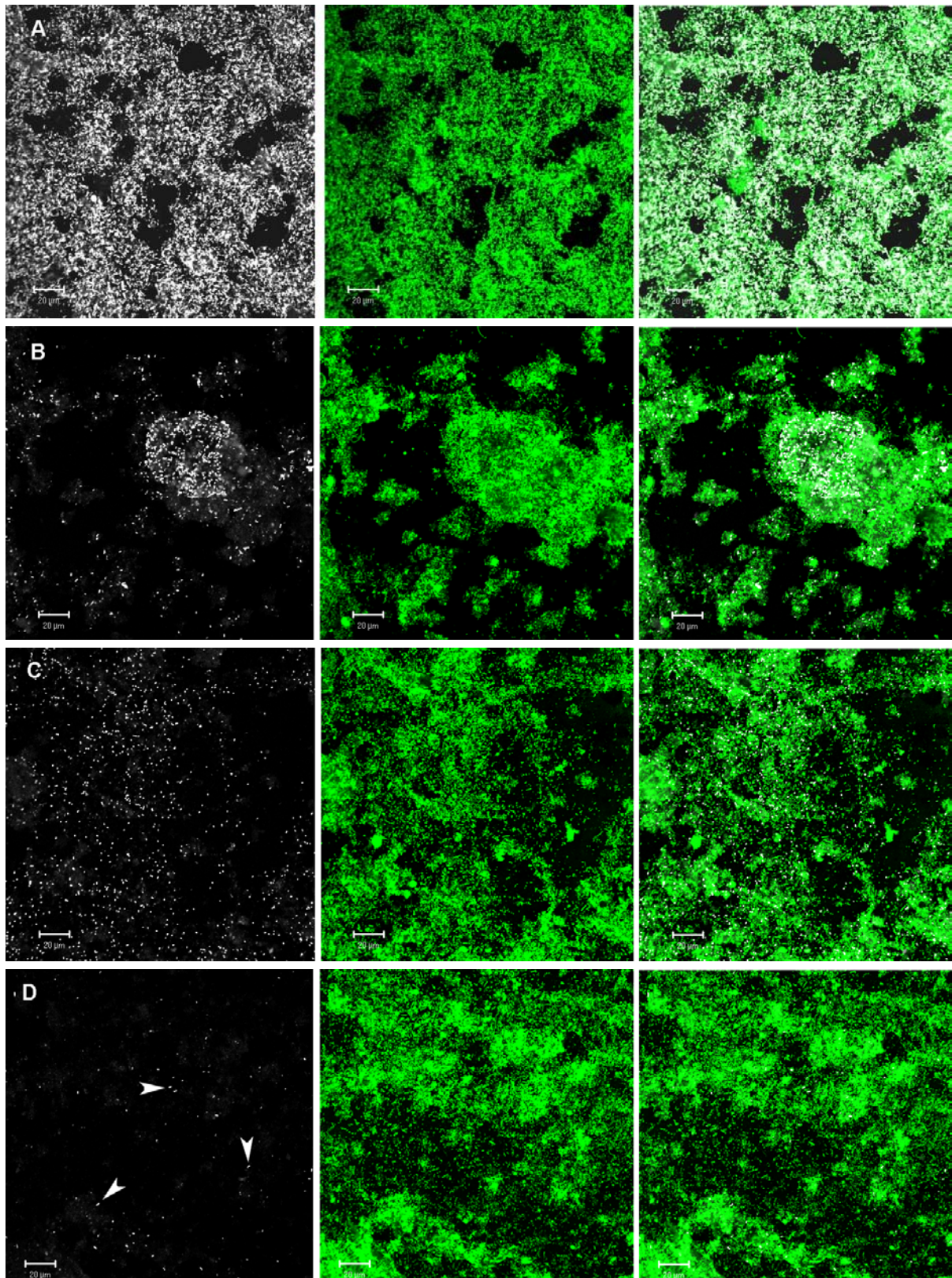
**Tableau XIII : Composition des biofilms à J-12 avant traitement déterminée par hybridation avec les sondes de groupe et analyse d'images. Les pourcentages sont exprimés par rapport à la biomasse totale marquée en syto-9. La ligne "Inconnu" correspond à la différence de la somme des pourcentages des sondes de groupes par rapport au pourcentage de MixEUB338. ND = Non Déterminé.**

	Ozone	Electro-chloration	Dioxyde de chlore	Mono-chloramine	Chlore	Cuivre-argent	Témoin
<b>Boucles</b>							
MixEUB338	41,1	71,5	28,6	25,7	28,3	46,7	76,4
Ecart type	6,2	5,7	8,7	10,7	5,1	20,3	16,0
Alf 968	7,8	4,3	0,0	0,0	0,0	3,9	10,1
Bet42a	6,5	62,4	22,1	15,4	12,7	9,2	65,1
Gam42a	5,3	0,4	2,6	0,0	2,6	0,0	14,5
SRB385	0,3	1,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
Inconnu	21,2	3,4	3,9	10,3	12,6	33,5	-13,3
<b>Bras morts</b>							
MixEUB338	ND	12,4	22,7	23,4	ND	ND	ND
Ecart type	ND	2,26	3,76	3,17	ND	ND	ND
Alf 968	ND	0,5	0,5	0,5	ND	ND	ND
Bet42a	ND	1,2	7,2	36,7	ND	ND	ND
Gam42a	ND	0	0	0	ND	ND	ND
SRB385	ND	0	0	0	ND	ND	ND
Inconnu	ND	10,7	15	-13,8	ND	ND	ND

#### III-1.3.3.d. Composition des biofilms des bras morts

La plupart des échantillons de biofilms issus des bras morts en cuivre n'ont pas pu être hybridés, les sondes utilisées ne donnant aucun signal détectable bien que de la biomasse révélée par le syto-9 soit présente (Tab. XIII). Pour les échantillons sur lesquels l'hybridation est possible, les pourcentages de marquage avec MixEUB338 sont relativement faibles. Seule la sonde de groupe Bet42a spécifique des  $\beta$ -*Proteobacteria* a hybridé des quantités de biomasse importantes.





**Figure 45 : Exemples de champs observés après hybridation des biofilms issus de la boucle témoin. Colonne de gauche : marquages sondes, centre : marquages syto9, droite : superposition des deux marquages. A : hybridation avec MixEUB338, B : hybridation avec Bet42a, C : hybridation avec Gam42a, D : hybridation avec LEG705 (bactéries indiquées par les flèches). Le marquage par la sonde est représenté en blanc pour une meilleure visualisation.**



## III-2. ETUDE DES EFFETS DES DIFFERENTS TRAITEMENTS DE DESINFECTION

### III-2.1. Evaluation par culture

#### III-2.1.1. Boucles

##### III-2.1.1.a. Flore planctonique

- Flore hétérotrophe dénombrée sur gélose R2A (Fig. 46)

Une semaine après le début des traitements, une disparition complète et durable de la flore dénombrée sur gélose R2A est observée dans le cas des traitements au chlore (chlore issu d'eau de Javel et électro-chloration). Dans le cas de l'ozone et du dioxyde de chlore, la réduction est de 3 à 4 log puis les dénombrements restent ensuite faibles voire nuls durant le reste de l'étude. La réduction observée avec la monochloramine n'est que de 1 log après une semaine, elle est suivie d'une ré-augmentation après 35 jours de traitement. La solution mère de monochloramine s'est révélée très instable, elle a dû être renouvelée 2 fois par jour durant l'essai de désinfection. La durée de l'essai pour ce traitement a donc été réduite à 35 jours, et la concentration atteinte n'est que de 0,5 mg/L au lieu de la concentration de 2 mg/L initialement prévue. Dans le cas du traitement au cuivre-argent une réduction de 2 log environ est observée après une semaine, les dénombrements restent ensuite stables à une valeur de 3,5 à 4 log UFC/mL. Les valeurs des dénombrements dans la boucle non traitée varient entre 4 et 6 log UFC/mL.

- *L. pneumophila* dénombrée selon la norme AFNOR (Fig. 46 et 47)

Après 48 h de traitement *L. pneumophila* devient indétectable par culture à partir des prélèvements d'eau des boucles traitées par l'électrochloration, le dioxyde de chlore, la monochloramine et le chlore, et elle le reste pendant toute la durée des traitements. Dans le cas de l'ozone, quelques dénombrements sont observés pendant la phase de traitement, toujours à des valeurs inférieures à 1 UFC/mL. En revanche dans le cas du traitement au cuivre-argent un nombre important de prélèvements est resté positif en culture, avec un dernier dénombrement réalisé au 106<sup>ème</sup> jour à plus de 10 UFC/mL. Dans la boucle témoin, la population de *L. pneumophila* varie entre 10 et 10<sup>3</sup> UFC/mL.

- Amibes dénombrées sur géloses NNA + *E. coli* (Fig. 46)

Le traitement au cuivre-argent ne réduit pas significativement la population amibienne planctonique. Dans le cas des autres traitements la diminution est d'au moins 1 log, mais les amibes ne sont jamais totalement éradiquées. Dans la boucle témoin la population reste stable entre 1 et 10 UFC/mL.

#### III-2.1.1.b. Biofilms (Fig. 46)

- Flore hétérotrophe dénombrée sur gélose R2A

Dans le cas du dioxyde de chlore plus aucune bactérie n'est cultivée sur gélose R2A à partir des biofilms prélevés à J6 et J35 alors que quelques-unes le sont encore à partir de la phase planctonique. La flore des biofilms issus de la boucle traitée au cuivre-argent est d'abord réduite de 4 logs, puis augmente ensuite de 2,5 logs UFC/cm<sup>2</sup>. Alors que le dénombrement réalisé à J6 dans la boucle traitée à l'ozone est nul, les suivants sont positifs à 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>. Les dénombrements réalisés sur les boucles traitées au chlore et à l'électrochloration restent nuls, tandis que ceux sur la boucle témoin et la boucle traitée à la monochloramine restent stables à 10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup>.

- *L. pneumophila* dénombrée selon la norme AFNOR

Encore plus que dans le cas de la flore hétérotrophe, l'évolution est proche de celle observée en phase planctonique. Seul le biofilm prélevé à J6 dans la boucle traitée à la monochloramine est positif alors que l'eau prélevée à cette même date ne l'est pas. Dans la boucle témoin, la concentration des biofilms en *L. pneumophila* varie entre 50 et 500 UFC/cm<sup>2</sup>.

- Amibes dénombrées sur géloses NNA + *E. coli*

Les amibes sont aussi détectées durant toute l'étude, sans qu'il soit réellement possible de mettre en évidence une diminution importante et durable sauf peut-être dans le cas du traitement à l'électrochloration.

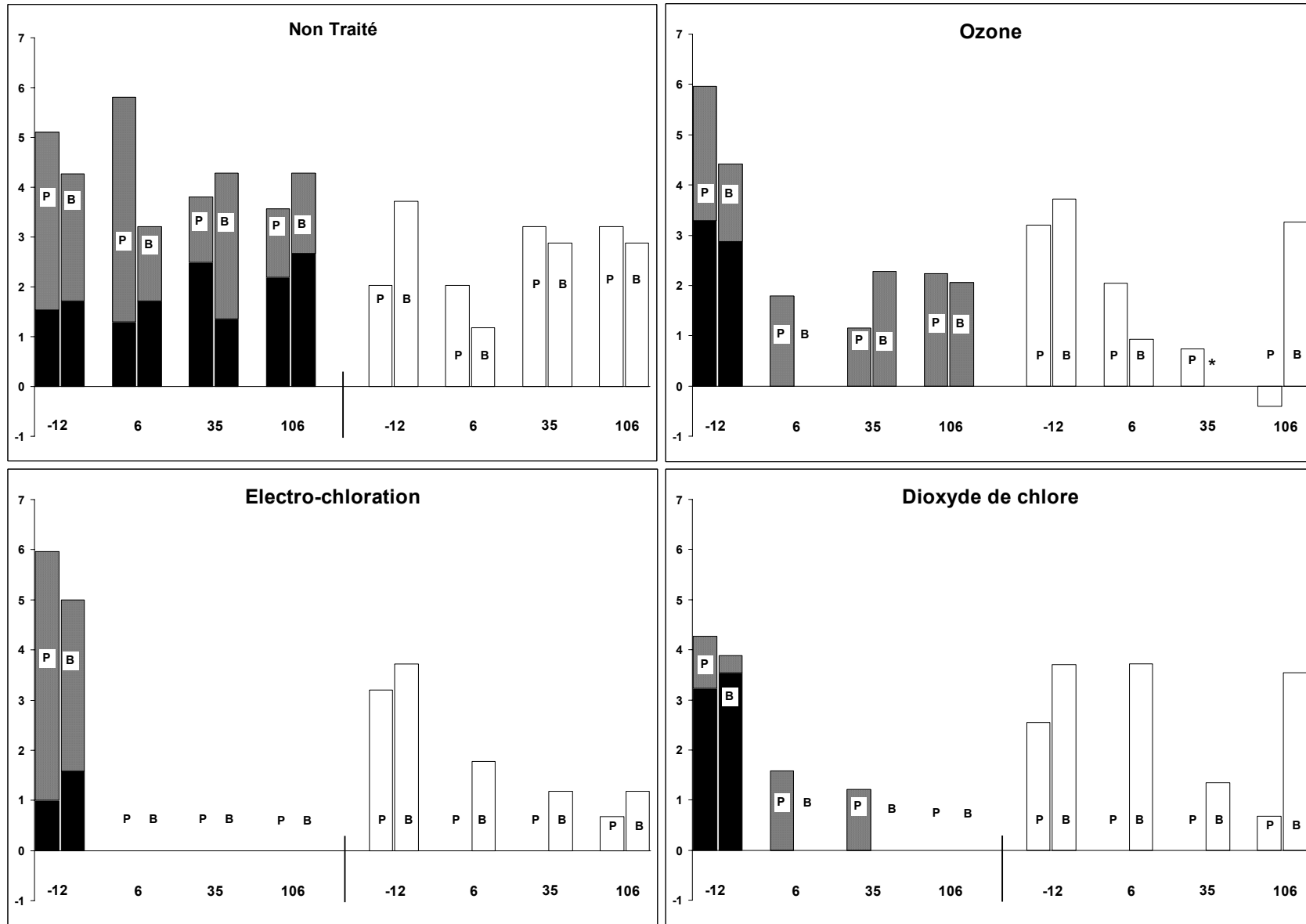


Figure 46 (légende page suivante)

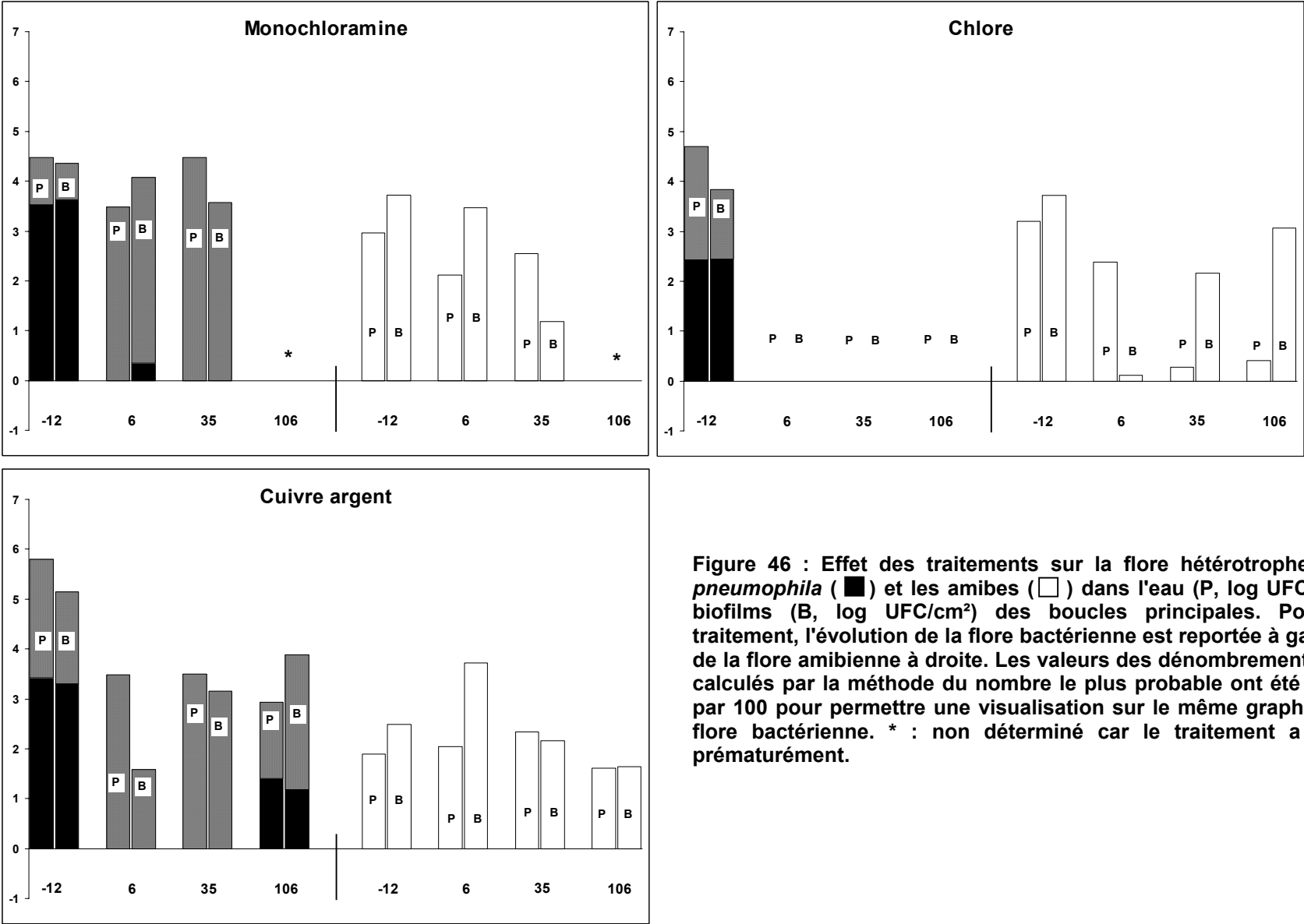


Figure 46 : Effet des traitements sur la flore hétérotrophe (▨), *L. pneumophila* (■) et les amibes (□) dans l'eau (P, log UFC/mL) et les biofilms (B, log UFC/cm<sup>2</sup>) des boucles principales. Pour chaque traitement, l'évolution de la flore bactérienne est reportée à gauche, celle de la flore amibienne à droite. Les valeurs des dénombrements amibiens calculés par la méthode du nombre le plus probable ont été multipliées par 100 pour permettre une visualisation sur le même graphique que la flore bactérienne. \* : non déterminé car le traitement a été arrêté prématurément.

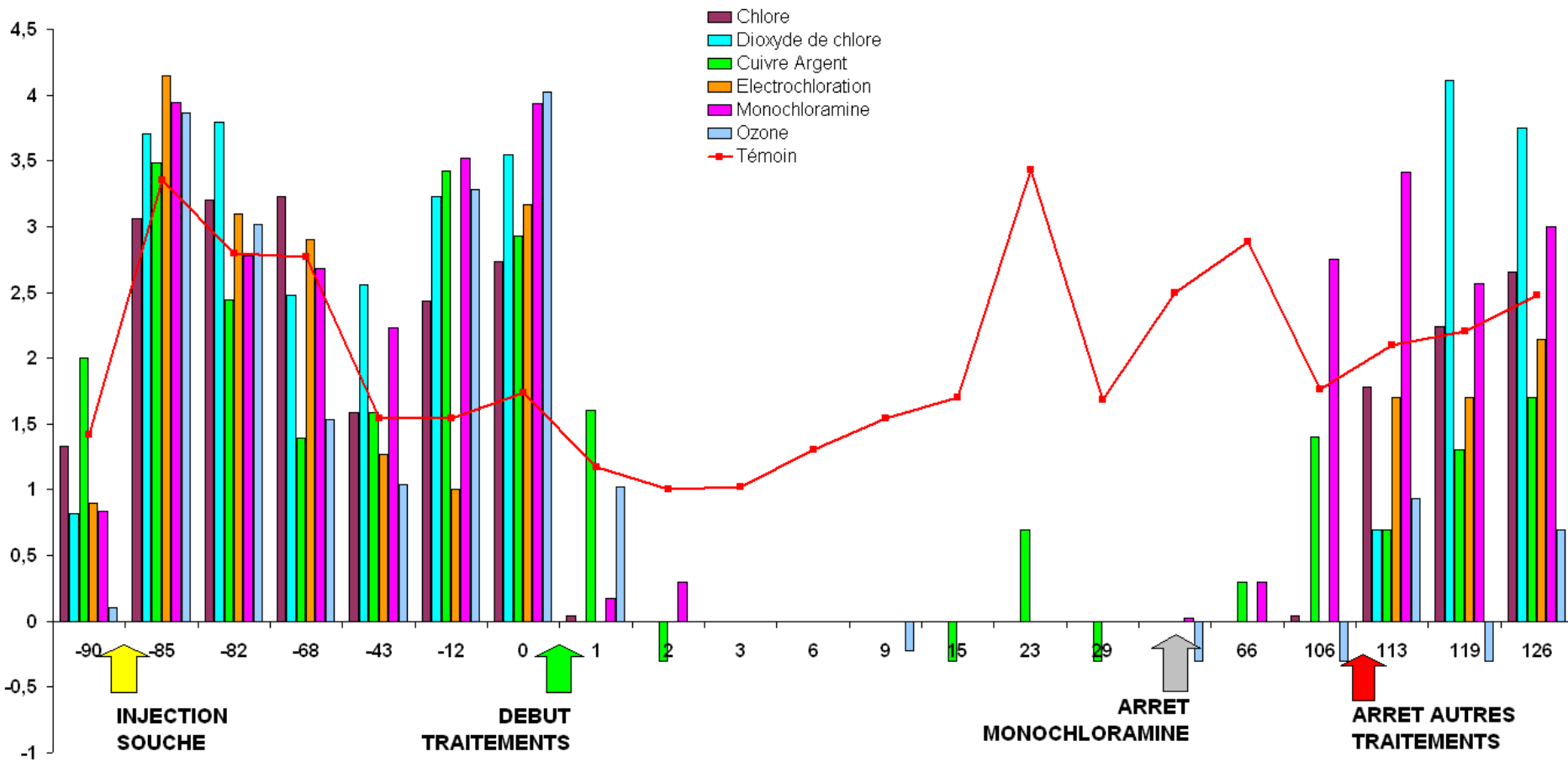


Figure 47 : Evolution des dénombrements de *L. pneumophila* réalisés dans l'eau des boucles pendant toute la durée de l'étude. Valeurs reportées en log UFC/mL en fonction des jours auxquels ont été réalisés les prélèvements.

### III-2.1.2. Bras morts (Fig. 48 & 49)

Parmi tous les traitements, seul le dioxyde de chlore a une action sur *L. pneumophila* : quand le remplacement quotidien de la totalité du volume de l'eau du bras mort par de l'eau provenant de la boucle est instauré, *L. pneumophila* devient indétectable dans l'eau et dans les biofilms. Les dénombrements de la flore hétérotrophe et des amibes restent cependant inchangés. Concernant les autres traitements, aucune variation des dénombrements pouvant être corrélée avec l'instauration de la désinfection ou le changement du régime de renouvellement de l'eau n'est observée : les valeurs restent homogènes et semblables à celles observées dans la boucle témoin pendant toute la durée de l'étude.

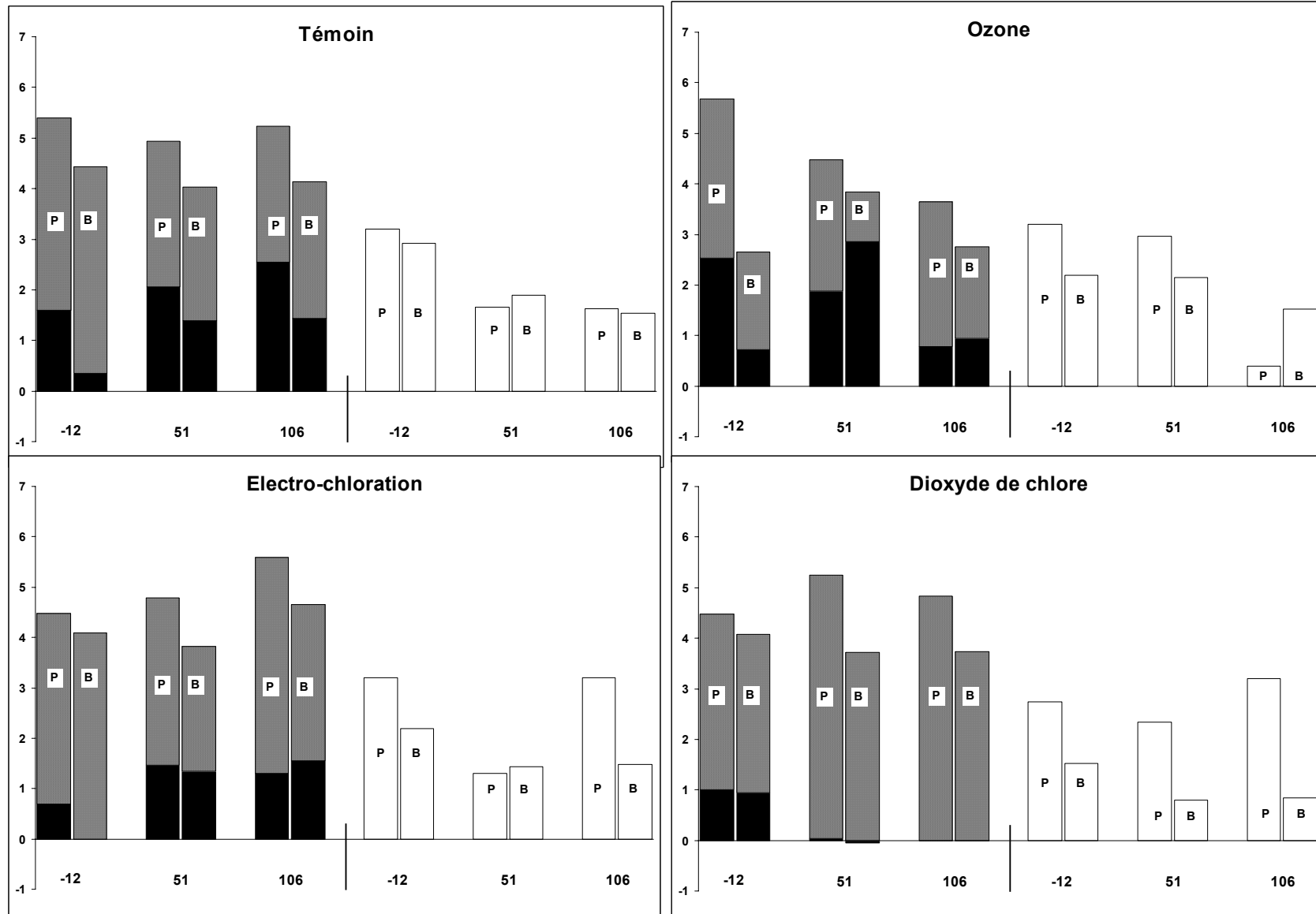


Figure 48 (légende page suivante)

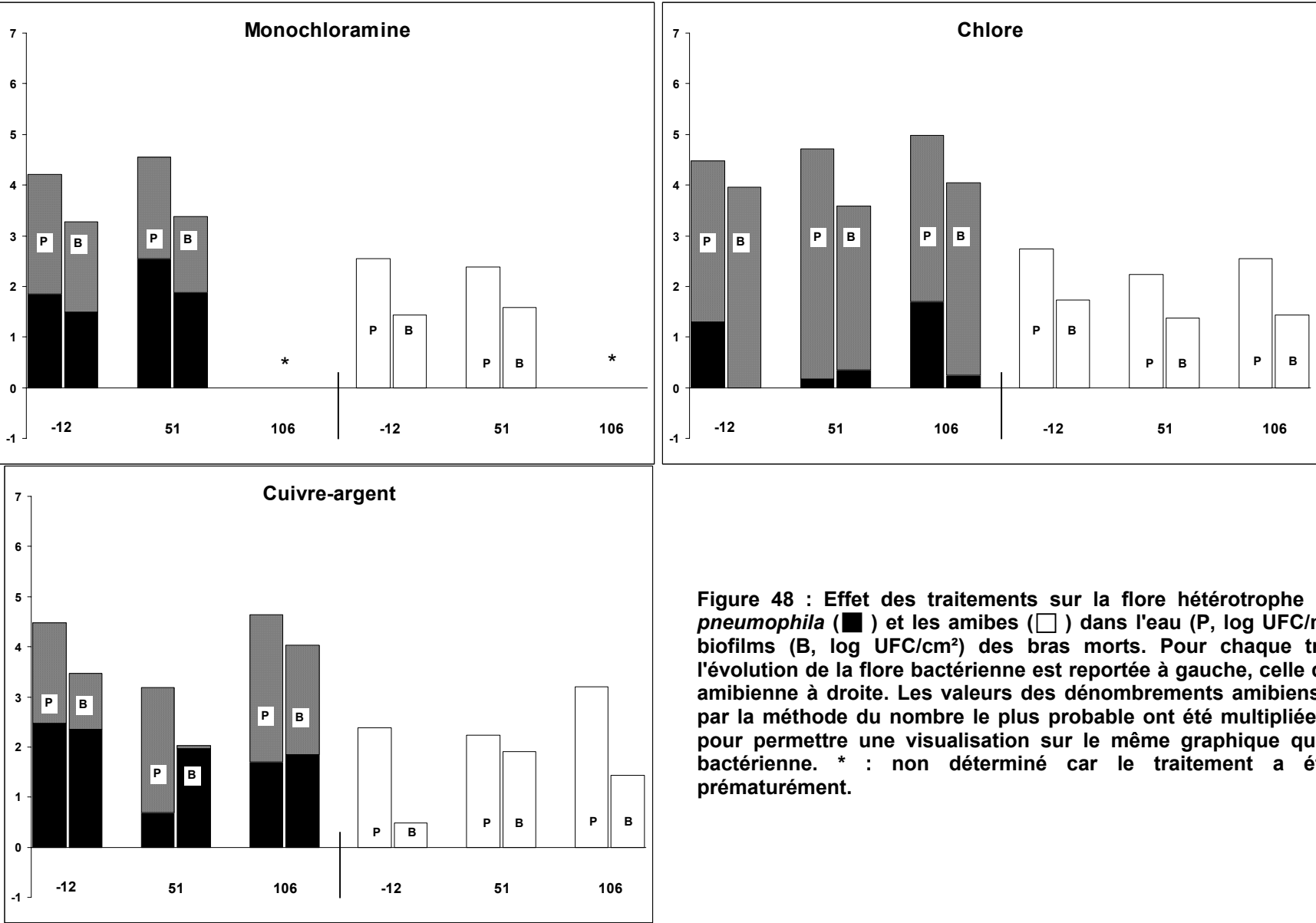


Figure 48 : Effet des traitements sur la flore hétérotrophe (▨), *L. pneumophila* (■) et les amibes (□) dans l'eau (P, log UFC/mL) et les biofilms (B, log UFC/cm<sup>2</sup>) des bras morts. Pour chaque traitement, l'évolution de la flore bactérienne est reportée à gauche, celle de la flore amibienne à droite. Les valeurs des dénombrements amibiens calculés par la méthode du nombre le plus probable ont été multipliées par 100 pour permettre une visualisation sur le même graphique que la flore bactérienne. \* : non déterminé car le traitement a été arrêté prématurément.



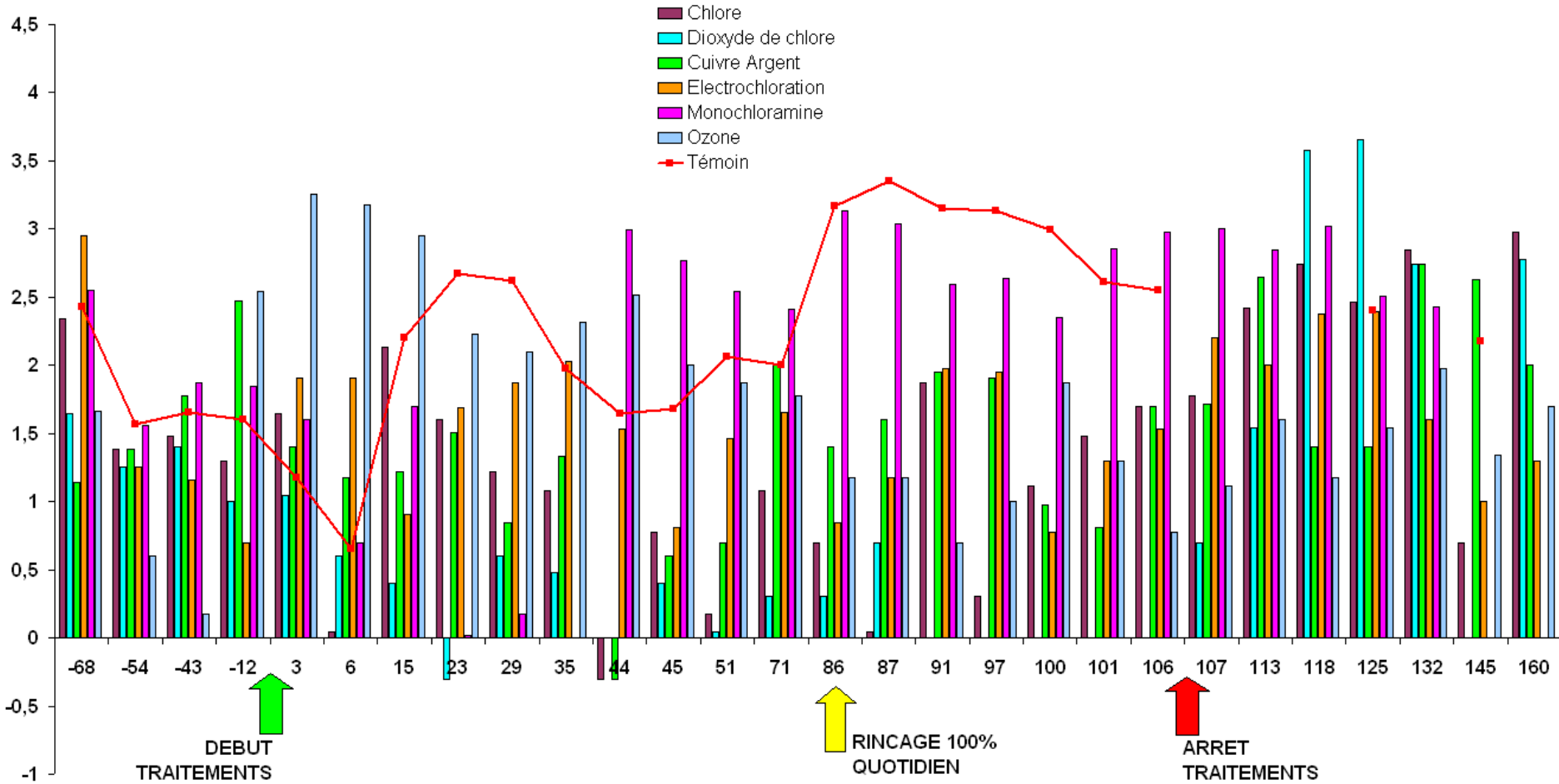


Figure 49 : Evolution des dénombrements de *L. pneumophila* réalisés dans l'eau des bras morts pendant toute la durée de l'étude. Valeurs reportées en log UFC/mL en fonction des jours auxquels ont été réalisés les prélèvements.

## III-2.2. Effet des traitements évalué par marquage LIVE/DEAD

### III-2.2.1. Boucles

La biomasse totale des coupons de la boucle témoin a varié pendant l'étude entre  $6,9 \pm 0,3 \times 10^4 \mu\text{m}^3 / \text{champ}$  à J-12 et  $9,7 \pm 1,0 \times 10^4 \mu\text{m}^3 / \text{champ}$  à J106 (Fig. 51A). Parallèlement, la proportion de biomasse marquée à l'IP a augmenté de  $1,1 \pm 5,6\%$  à  $18,2 \pm 9,5\%$ . Six jours après le début des traitements la biomasse est complètement absente des coupons PVC prélevés dans les boucles traitées au chlore (eau de Javel et électrochloration) (Fig. 50 & 51B). Quelques bactéries marquées au syto-9 subsistent pendant toute la durée de l'étude sur les coupons issus de la boucle traitée à l'ozone mais sont trop peu nombreuses pour être prises en compte en analyse d'images (Fig. 51F). Dans le cas du traitement au dioxyde de chlore la biomasse a diminué de  $3,1 \pm 1,9 \times 10^4$  à  $1,7 \pm 0,7 \times 10^4 \mu\text{m}^3 / \text{champ}$  après 6 jours, avec un doublement de la proportion de bactéries mortes. Cependant les nombreuses amibes présentes sur certains champs ont été comptabilisées dans la biomasse vivante, la proportion de bactéries mortes dans les biofilms est donc sous-évaluée (Fig. 51C). La biomasse n'est plus détectée après 35 jours de traitement au dioxyde de chlore. Le traitement avec la monochloramine à une concentration de 0,5 mg/L entraîne une augmentation importante de la proportion de biomasse marquée à l'IP, de  $10,9 \pm 7,3\%$  à  $71,8 \pm 17,8\%$ , tandis que la quantité de biomasse totale reste constante à approximativement  $2,1 \times 10^4 \mu\text{m}^3 / \text{champ}$  (Fig. 51D). Après 35 jours la proportion de biomasse marquée à l'IP diminue à 17%. Dans le cas du traitement au cuivre-argent nous avons observé une diminution importante de la quantité de biomasse qui passe de  $7,4 \pm 5,4$  à  $0,6 \pm 0,3 \times 10^4 \mu\text{m}^3 / \text{champ}$  après 6 jours de traitement (Fig. 51E), avec une proportion de biomasse marquée à l'IP passant de  $2,6 \pm 5,4\%$  à  $40,6 \pm 3,1\%$ . La biomasse totale reste ensuite constante et la part marquée à l'IP passe à  $4,2 \pm 8,2\%$ .

Des micro-organismes présentant une morphologie d'amibe (Fig. 51F & G) ont fréquemment été observés sur la plupart des coupons sur lesquels subsistait de la biomasse bactérienne en quantité importante (témoin, monochloramine et cuivre-argent).

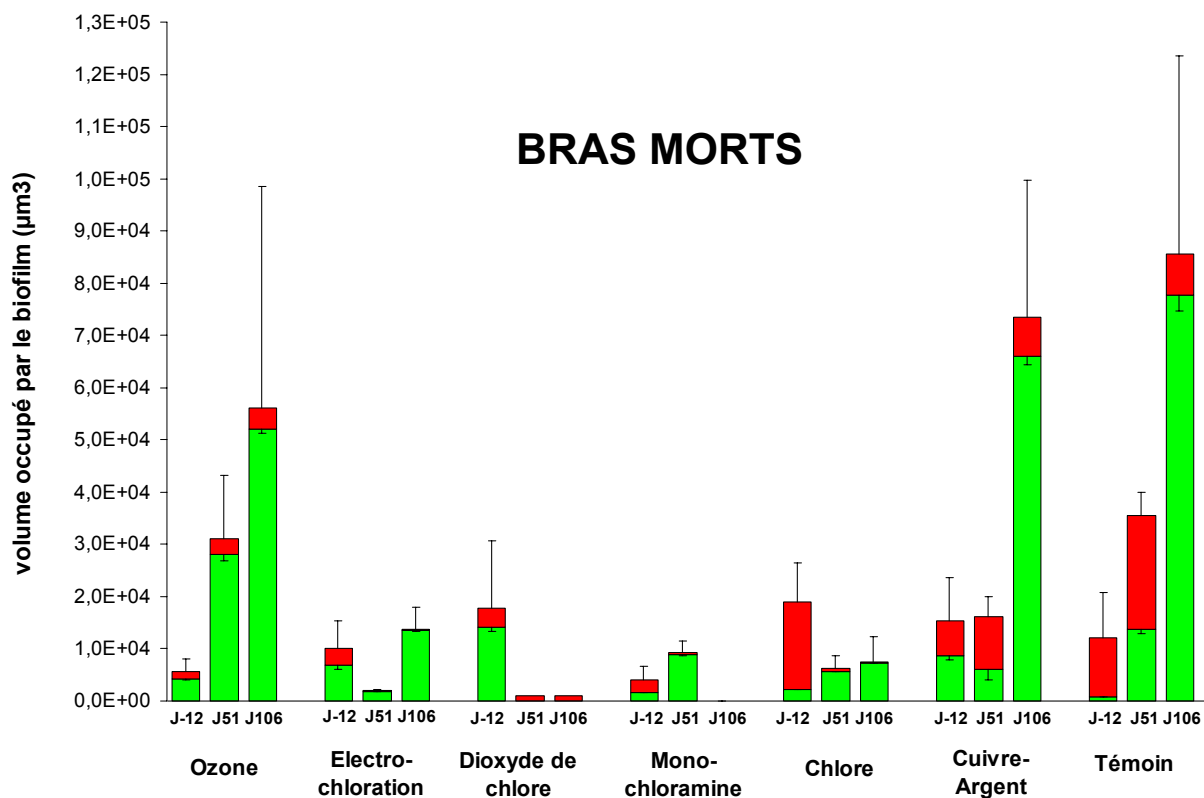
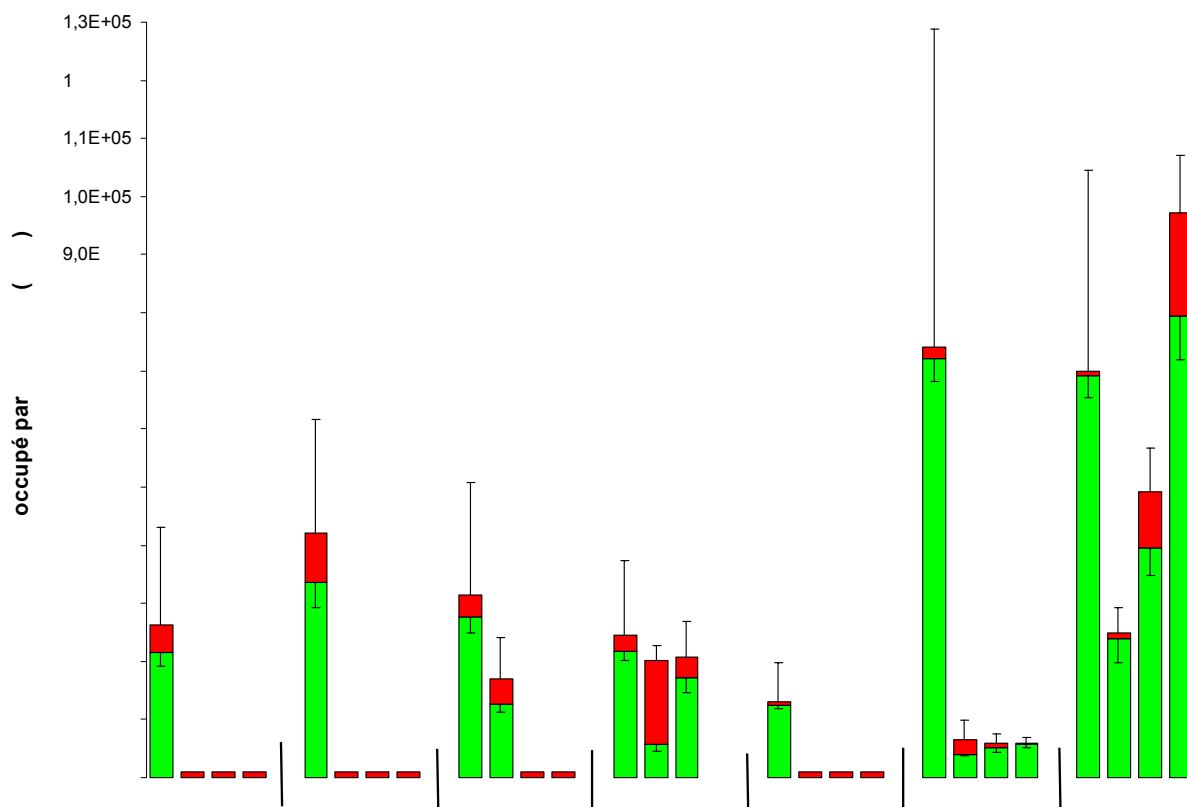


Figure 50 : Biomasse totale et proportion des biomasses marquée par le syto-9 (vivant) et l'IP (mort) déterminées par marquage LIVE/DEAD et analyse d'images. La barre supérieure représente l'erreur type déterminée lors du calcul de la biomasse totale, la barre inférieure celle déterminée lors du calcul de la proportion de biomasse marquée par l'IP. \* : non déterminé car le traitement a été arrêté prématurément.

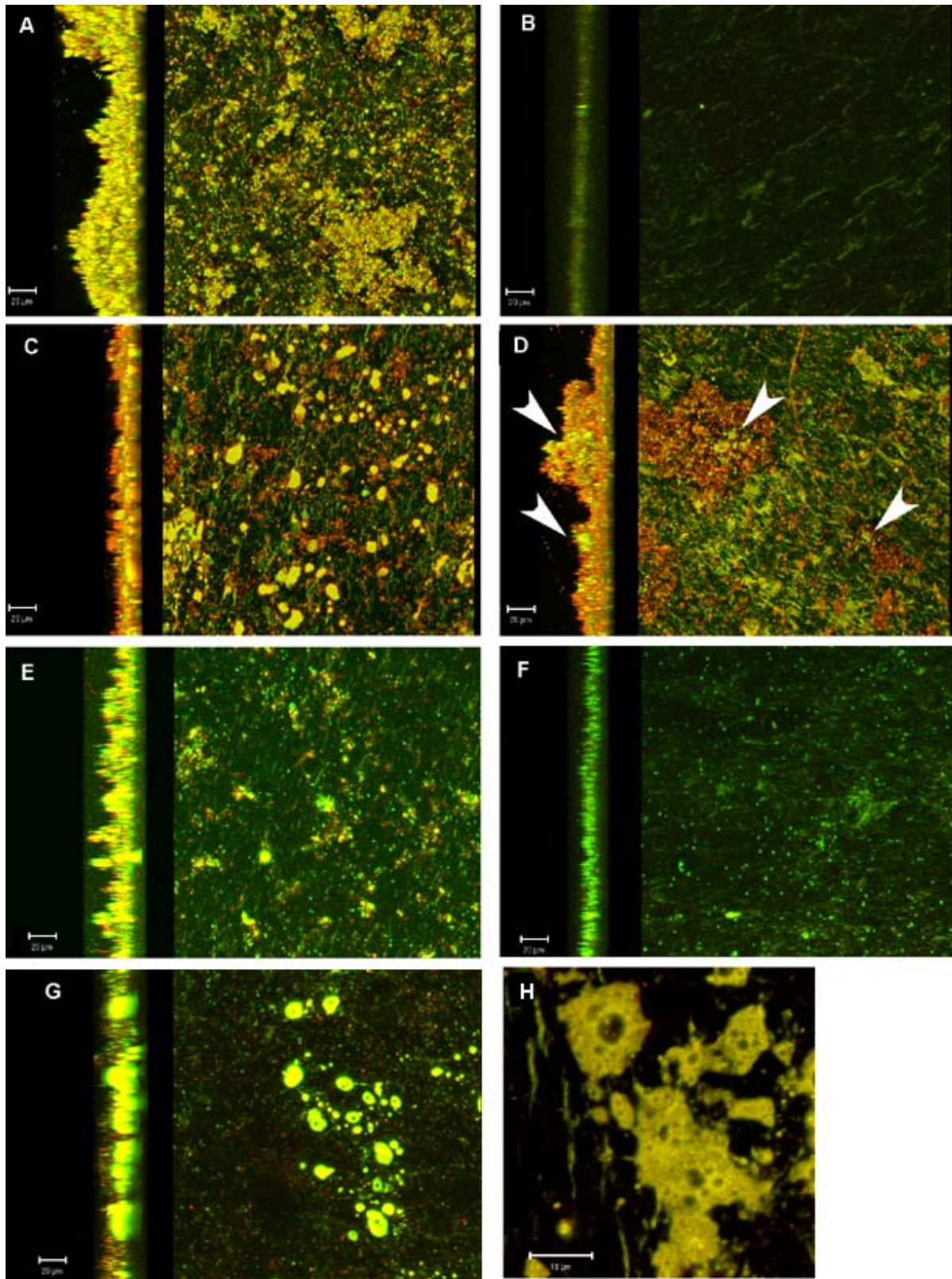


Figure 51 : Différents aspects des biofilms issus des boucles et marqués au LIVE/DEAD pendant l'étude. A : biofilm témoin à J106, B : biofilm provenant de la boucle traitée par électrochloration à J6, C : biofilm provenant de la boucle traitée par le dioxyde de chlore à J6, D : biofilm provenant de la boucle traitée par la monochloramine à J6 (les flèches indiquent des amas de bactéries marquées en syto-9), E : biofilm provenant de la boucle traitée par le cuivre-argent à J6, F : biofilm provenant de la boucle traitée par l'ozone à J6, G et H : micro-organismes présentant un aspect d'amibes observés dans la boucle traitée au cuivre-argent à J6.

## III-2.2.2. Bras morts

Le biofilm prélevé à J-12 dans le bras mort du circuit témoin présente une biomasse majoritairement marquée par l'IP, cette proportion diminue ensuite progressivement tandis que la biomasse totale augmente de  $1,2 \pm 0,86$  à  $8,5 \pm 3,7 \times 10^4 \mu\text{m}^3 / \text{champ}$  (Fig 52C). Le seul traitement qui a eu un effet important et durable sur les biofilms des bras morts en cuivre est le dioxyde de chlore. Alors que quelques bactéries persistaient encore après 51 jours de traitement, quand le renouvellement de l'eau n'était que de 25% /j, plus aucune n'est détectée à J106 après 20 jours de renouvellement quotidien complet (Fig. 52A &B). Il semblerait que les traitements au chlore et à l'électrochloration aient limité le développement du biofilm : à J106 les quantités de biomasse sur les coupons PVC sont moins importantes que dans le cas du circuit témoin (Fig. 52E &F). Les bactéries présentes sont exclusivement colorées au syto-9. La quantité de biomasse sur le coupon PVC prélevé à J51 sur le circuit traité à la monochloramine est très peu différente de la quantité de biomasse avant traitement, cependant l'absence de prélèvement à J106 rend difficile toute conclusion. Dans le cas du traitement au cuivre-argent il n'existe pas de différence entre les biofilms prélevés à J-12 et J51, en revanche à J106 le biofilm est important (Fig. 52D). Les coupons prélevés dans le circuit traité à l'ozone présentent une quantité de biomasse croissante, avec une majorité de bactéries marquées par le syto-9.



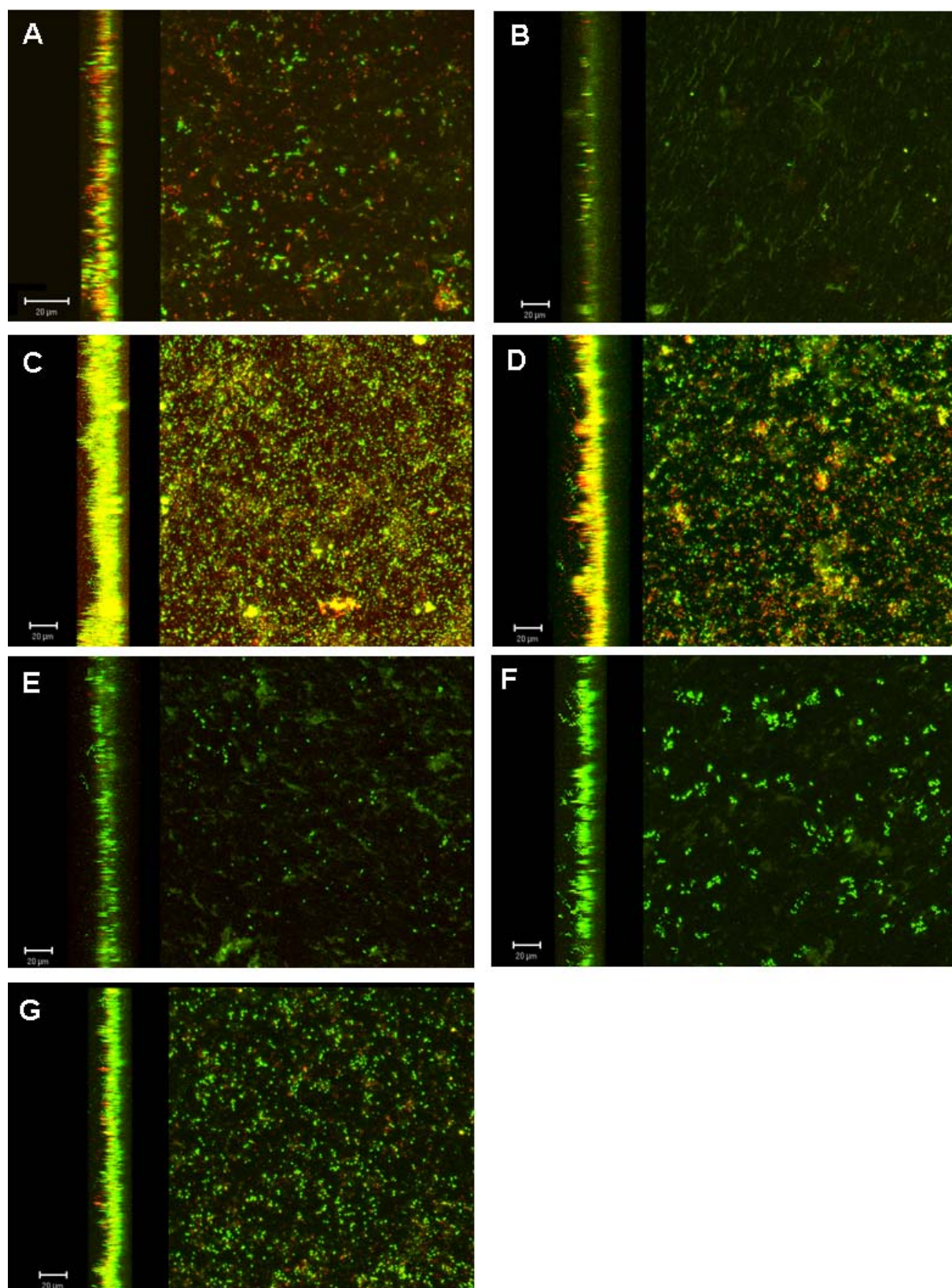


Figure 52 : Différents aspects des biofilms issus des bras morts et marqués au LIVE/DEAD pendant l'étude. A : biofilm provenant du bras mort traité par le dioxyde de chlore à J-12, B : idem à J106, C : biofilm provenant du bras mort témoin à J106, D : biofilm provenant du bras mort traité par le cuivre-argent à J106, E : biofilm provenant du bras mort traité par le chlore à J106, F : biofilm provenant du bras mort traité par électrochloration à J106, G : biofilm provenant du bras mort traité par l'ozone à J106.

### III-2.3. Effet des traitements évalué par marquage FISH

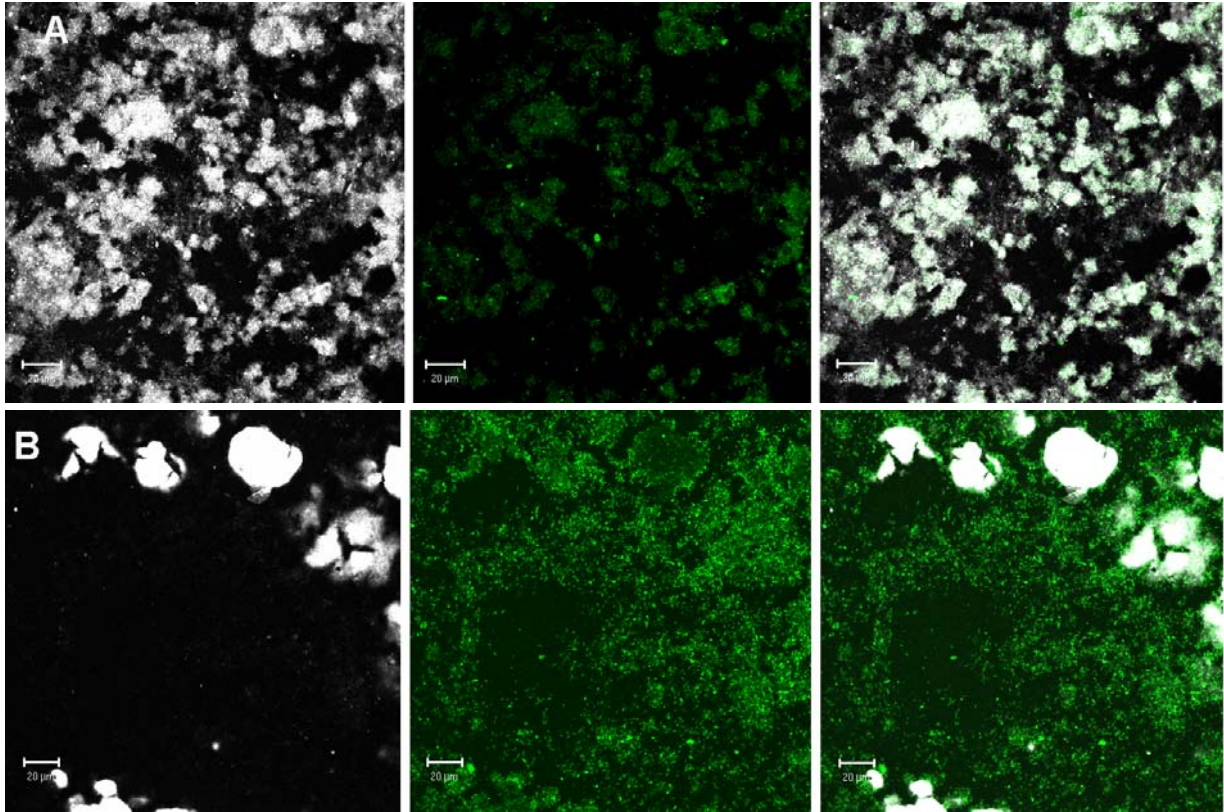
#### III-2.3.1. Boucles

L'hybridation des biofilms issus des boucles après 6 jours de traitement n'a permis de révéler la biomasse que dans le cas de la boucle traitée à la monochloramine et dans la boucle témoin (Tab. XIV). Dans le cas de la boucle témoin, le pourcentage de biomasse marqué par MixEUB338 est moins important qu'à J-12, les *β-Proteobacteria* sont toujours prédominantes, accompagnées d'*α-Proteobacteria*, mais les *γ-Proteobacteria* ne sont plus détectées. 25% de la biomasse révélée en syto-9 est marquée par MixEUB338 dans les biofilms traités à la monochloramine mais aucune des sondes de groupe utilisées ne permet un comptage par analyse d'images qui soit significativement différent du comptage après hybridation avec Non338. Dans les boucles traitées à l'électrochloration, au dioxyde de chlore et au chlore il n'y a plus de biomasse détectable, que ce soit avec les sondes ou en syto-9. Dans le cas de la boucle traitée à l'ozone, les champs observés après hybridation comportent de nombreuses "taches" bleues (sondes EUB338, sondes de groupes et sonde Non338), sans pourtant qu'une biomasse importante ne soit observable en marquage syto-9 (Fig. 53A). Il semble donc que l'ozone a induit une modification dans certains composés du biofilm (exopolymères ?) qui résulte dans la fixation des sondes et / ou du fluorochrome. Enfin dans le cas du traitement au cuivre-argent des "taches" d'aspect différent, plus larges, sont aussi apparues, rendant toute quantification impossible alors que le marquage au syto-9 permet la révélation d'une biomasse relativement importante (Fig. 53B).

Les légionelles sont détectées avec la sonde LEG705 en faible nombre dans le biofilm de la boucle témoin uniquement.

**Tableau XIV : Composition des biofilms des boucles à J6 après traitement déterminée par hybridation avec les sondes de groupe et analyse d'images. ND = Non Déterminé.**

	Ozone	Electro-chloration	Dioxyde de chlore	Mono-chloramine	Chlore	Cuivre-argent	Témoin
<b>Boucles (J6)</b>							
MixEUB338	ND	0,0	0,0	24,9	0,0	ND	37,8
Ecart type	ND	0,0	0,0	1,8	0,0	ND	9,8
Alf 968	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	8,2
Bet42a	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	30,7
Gam42a	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	0,0
SRB385	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	0,0
Inconnu	ND	0,0	0,0	24,9	0,0	ND	-1,1



**Figure 53 : Hybridation avec MixEUB338 des biofilms issus des boucles traitées à l'ozone (A) et au cuivre-argent (B), après 6 jours de traitement. A gauche : marquage sonde, au centre : marquage syto-9, à droite : superposition des deux marquages.**

### III-2.3.2. Bras morts

Les hybridations réalisées sur les biofilms prélevés à J51 ont permis de détecter des bactéries hybridées avec MixEUB338 dans tous les échantillons (Tab. XV). Les pourcentages de biomasse hybridée sont souvent faibles, inférieurs à 22% sauf dans le cas du chlore et de la canalisation témoin. La seule sonde de groupe ayant permis une détection est la sonde Bet42a, dans les canalisations traitées par électrochloration, dioxyde de chlore, chlore et dans la canalisation témoin. Elle n'hybride cependant qu'avec moins de la moitié de la flore hybridée avec MixEUB338. Pour les autres traitements, la flore hybridée avec MixEUB338 n'est hybridée avec aucune des sondes de groupes utilisées (y compris CF319a et Gram +).



**Tableau XV : Composition des biofilms des bras morts à J51 après traitement déterminée par hybridation avec les sondes de groupe et analyse d'images.**

	Ozone	Electro-chloration	Dioxyde de chlore	Mono-chloramine	Chlore	Cuivre-argent	Témoin
<b>Bras morts (J51)</b>							
MixEUB338	8,5	21,9	17,8	10,6	41,9	11,4	47,8
Ecart type	1,7	1,7	2,0	1,3	4,9	1,7	2,9
Alf 968	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bet42a	0,0	6,9	9,5	0,0	12,7	0,0	15,0
Gam42a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SRB385	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Inconnu	8,5	15,0	8,3	10,6	29,2	11,4	32,8

### III-3. RECOLONISATION APRES ARRET DES TRAITEMENTS

Quatre à cinq jours après l'interruption des traitements, les dénombrements en *L. pneumophila* de l'eau des boucles principales est remontée à des taux comparables à ceux mesurés avant traitement (Fig. 47). Le même phénomène est observé avec *L. pneumophila* dans les biofilms, par ailleurs la contamination ambiante retrouve aussi son niveau initial (données non présentées). Dans les bras morts, la canalisation traitée au dioxyde de chlore retrouve aussi son niveau de contamination initial, tandis que pour les autres traitements aucun changement n'est observé (Fig. 49).

### III-4. DISCUSSION

#### III-4.1. Traitements

##### III-4.1.1. Flore bactérienne

Pendant la période de colonisation de 3 mois, les dénombrements de l'eau des boucles principales et des bras morts ont varié mais sont toujours restés supérieurs à la valeur critique de  $10^3$  UFC/L au-dessus de laquelle des mesures correctives doivent être prises (Fig. 47 & 49). Les biofilms des bras morts en cuivre sont moins contaminés que ceux des boucles principales, tandis qu'en phase planctonique seule la contamination par *L. pneumophila* est moins importante. Ces différences ont déjà été décrites dans la littérature : le cuivre a une activité

bactéricide, il est donc généralement moins contaminé que d'autres matériaux (Rogers *et al.* 1994a; van der Kooij *et al.* 2002). Ces résultats sont valables dans le cas de canalisations neuves, non colonisées. Dans le cas de canalisations en place depuis plusieurs années, l'activité bactéricide a complètement disparu et ces différences de taux de contamination ne sont plus observées (Tiefenbrunner *et al.* 1993).

Le traitement au cuivre-argent a montré une efficacité médiocre. L'activité bactéricide de ce traitement serait due aux ions chargés positivement qui créent des liaisons électrostatiques avec les structures de la paroi bactérienne chargées négativement, entraînant une modification de la perméabilité membranaire et une dénaturation des protéines qui aboutissent à la lyse cellulaire (Liu *et al.* 1994). Dans notre étude, le pH de l'eau (7,6) a entraîné une précipitation importante du cuivre, qui a lieu dès que le pH dépasse la valeur de 5 (Lin *et al.* 2002), diminuant ainsi l'activité bactéricide due à cet ion. Plusieurs études décrivent l'utilisation de ce type de traitement pour désinfecter des réseaux intérieurs contaminés par *L. pneumophila*. Liu *et al.* font état d'une efficacité satisfaisante démontrée par une diminution significative des prélèvements d'eau positifs 4 mois après l'installation d'un ionisateur délivrant des concentrations de 0,4 / 0,04 mg/L de cuivre et d'argent (Liu *et al.* 1994). Les auteurs soulignent le délai important avant la disparition de *L. pneumophila* détectée par culture, inconvénient compensé par la stabilité du traitement à température élevée permettant l'utilisation simultanée des deux techniques, et par une efficacité rémanente jusqu'à 2 mois après l'arrêt du dispositif. Du fait de la précipitation importante du cuivre dans l'eau, il semblerait que l'activité bactéricide soit essentiellement due aux ions argent. Or les légionelles sont capables de développer une tolérance à ces ions : dans une étude menée pendant 3 ans avec des doses moyennes de 0,2 / 0,006 mg/L, Rohr *et al.* ont observé une diminution importante de la contamination (4 log) la première année, suivie d'une augmentation avec un retour aux taux initiaux les deux années suivantes (Rohr *et al.* 1999). Les auteurs ont constaté que les légionelles isolées à partir de l'eau traitée pendant 4 ans présentent une tolérance importante aux ions argent : l'augmentation de la concentration à une valeur de 0,03 mg/L n'entraîne qu'une réduction de 1,3 log. Par ailleurs ces traitements sont inefficaces vis-à-vis des amibes aux doses recommandées pour le traitement de l'eau potable (Rohr *et al.* 2000).

Dans le cas de l'ozone, trois pics de contamination inférieure à  $10^3$  UFC/L ont été observés pendant la période de traitement. L'effet bactéricide de l'ozone semble ne pas être limité à la colonne de contact, il est mesuré sur l'ensemble de la boucle de recirculation même en l'absence de résiduel détectable en sortie de colonne (données non rapportées). Cet effet peut s'expliquer par la persistance d'une concentration active en dessous de la limite de détection de la technique (0,1 mg/L) et/ou par l'effet bactéricide des radicaux hydroxyl résultant de la décomposition de l'ozone. Ces radicaux ont un potentiel d'oxydation (2,70V) plus important que celui de l'ozone (2,07V), leur  $Ct$  théorique à pH 8 est  $10^4$  fois moins important que celui de l'ozone, et  $10^6$  et  $10^7$  fois moins importants que ceux du chlore libre et du dioxyde de chlore, respectivement (Cho *et al.* 2003). Le dosage de ces radicaux dans l'eau lors des essais de désinfection doit donc être envisagé, bien que leur persistance soit sans doute très réduite. Le fait qu'ils soient générés par réaction de l'ozone avec la matière organique peut expliquer la disparition complète du biofilm après 6 jours de traitement : en début de traitement la quantité de matière organique est importante, il pourrait donc y avoir une production importante de radicaux libres et une activité bactéricide élevée. Une fois la matière organique consommée, la quantité de radicaux libres générés diminue et le biofilm peut recommencer à se développer.

La monochloramine réagit préférentiellement avec les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) et le tryptophane, ainsi qu'avec les acides nucléiques (Jacangelo *et al.* 1987). Elle inhibe ainsi les protéines et les processus dans lesquels elles interviennent, notamment la respiration cellulaire. Elle est peu réactive avec les exopolysaccharides et les sucres, ce qui favoriserait son cheminement dans les exopolymères (LeChevallier *et al.* 1988) et donc la pénétration dans les biofilms. Il est difficile de tirer des conclusions définitives à partir des résultats obtenus car la concentration atteinte (0,5 mg/L) est la concentration minimale recommandée par l'EPA (EPA 1999). Malgré des dénombrements de flore hétérotrophe dans l'eau et les biofilms de la boucle principale relativement peu affectés par l'instauration du traitement (diminution de 1 log environ), *L. pneumophila* est rapidement devenue indétectable par culture dans l'eau. Les observations après marquage de viabilité montrent une augmentation de la proportion de bactéries mortes de 11 à 70%, mais des amas de bactéries marquées au syto-9 persistent. Une observation relativement similaire a été réalisée sur des biofilms mixtes de *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*

développés sur des surfaces en acier inoxydable et traités avec une concentration de 2 mg/L de monochloramine : après 2 heures de traitement, les auteurs observent une activité métabolique persistant dans les couches profondes du biofilm (Huang *et al.* 1995). L'hybridation du biofilm prélevé à J6 avec les sondes de groupe s'est révélée négative, alors que 25% de la flore hybride avec MixEUB338. La monochloramine sélectionnant les bactéries nitrifiantes (Regan *et al.* 2003), nous avons vérifié la spécificité de nos sondes envers ces espèces : le seul groupe appartenant aux bactéries nitrifiantes mais qui n'hybride pas avec les sondes employées est le groupe *Nitrospira*. Or ce groupe peut être naturellement présent dans les biofilms des réseaux de distribution, il peut même représenter jusqu'à 78% des clones T-RFLP dans un biofilm âgé de 256 jours (Martiny *et al.* 2003). La faible dose de monochloramine utilisée dans la boucle principale pourrait donc avoir entraîné la sélection de cette population résistante, ce qui expliquerait l'augmentation de la proportion de bactéries vivantes observée à J35.

Le dioxyde de chlore et le chlore (obtenu à partir d'eau de Javel ou par électro-chloration) sont les traitements les plus efficaces aux doses employées dans cette étude. La destruction des biofilms est plus lente dans le cas du dioxyde de chlore mais la dose est 5 fois moins importante que pour le chlore. Par ailleurs, le dioxyde de chlore est le seul traitement capable d'entraîner une diminution importante et durable des légionelles dans l'eau et les biofilms des bras morts, ainsi qu'une disparition complète des biofilms observés à la surface des coupons PVC. Le dioxyde de chlore présente donc une activité résiduelle importante. Cependant le rinçage des bras morts avec de l'eau traitée doit être quotidien car sinon la contamination par les légionelles réapparaît après seulement 24 heures. Une étude récente menée sur site tend vers la même conclusion : le dioxyde de chlore utilisé à une dose de 0,8 mg/L est efficace pour contrôler la contamination d'un réseau intérieur par *L. pneumophila* (Srinivasan *et al.* 2003), même si la production de désinfectant est limitée à 12 heures par jour, 5 jours par semaine.

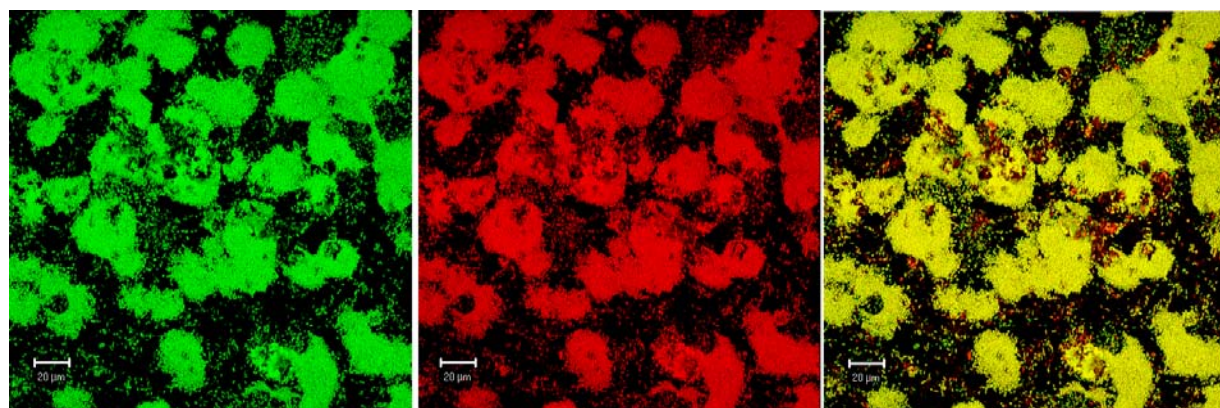
#### III-4.1.2. Amibes

Il n'existe pas de relation directe entre les traitements et la colonisation du pilote par les amibes, qui ont été isolées de façon régulière dans toutes les canalisations et pendant toute la durée de l'étude. De nombreux paramètres

influencent les quantités dénombrées sur gélose NNA. Il a été démontré que la présence de biofilms dans les canalisations entraîne une augmentation de la quantité d'amibes (Eisenmann *et al.* 1998; Barbeau *et al.* 2001), l'action des traitements de désinfection sur ces biofilms a donc un impact sur la prolifération amibienne. Ces traitements peuvent aussi induire un enkystement des amibes présentes, les rendant plus résistantes à la sonication et à la filtration utilisées lors des étapes de dénombrement (Pernin *et al.* 1998) et résultant finalement dans un dénombrement plus important. Par ailleurs il a aussi été décrit une adaptation des amibes aux traitements biocides utilisés dans les tours aéro-réfrigérantes, ces traitements ayant finalement un effet stimulant sur la croissance amibienne (Srikanth *et al.* 1993). Le fait que les amibes soient constamment isolées lors des campagnes de traitement constitue un problème majeur puisqu'il est largement décrit dans la littérature que ces organismes servent de véritables "Chevaux de Troie" pour les légionelles mais aussi pour d'autres espèces bactériennes capables de survivre dans les kystes (Kilvington *et al.* 1990). La recontamination rapide des canalisations après arrêt des traitements est typique d'une multiplication intra-amibienne, libérant quelques milliers de bactéries par amibe infectée après seulement quelques jours d'incubation (Hagele *et al.* 2000). Par ailleurs, certains traitements (chlore, électro-chloration, dioxyde de chlore) ont complètement éradiqué les biofilms aussi bien sur les coupons en PVC que sur les billes de verre (dénombrements sur gélose R2A nuls et pas de flore détectée en syto-9), il semble donc peu probable que *L. pneumophila* ai pu survivre à l'état viable mais non cultivable dans ces boucles. Les kystes du genre *Acanthamoeba* sont beaucoup plus résistants à des conditions environnementales défavorables que ceux des genres *Hartmannella* et *Naegleria* (Rodriguez-Zaragoza 1994), peut-être grâce à la présence de cellulose dans leur paroi (Winiecka-Krusnell *et al.* 2001). Par ailleurs les légionelles ne sont retrouvées que quasi-exclusivement dans les kystes d'amibes appartenant à ce genre, la survie dans les kystes de *Hartmannella* semble beaucoup plus rare et celle dans les kystes de *Naegleria* n'a pas été documentée (Fields 1993; Greub *et al.* 2003). Il peut donc raisonnablement être considéré, même si cela n'a pas été mis directement en évidence, que dans le pilote les kystes d'amibes ont effectivement servi de réservoirs à légionelles, permettant la recolonisation rapide des canalisations quelques jours seulement après l'interruption des traitements.

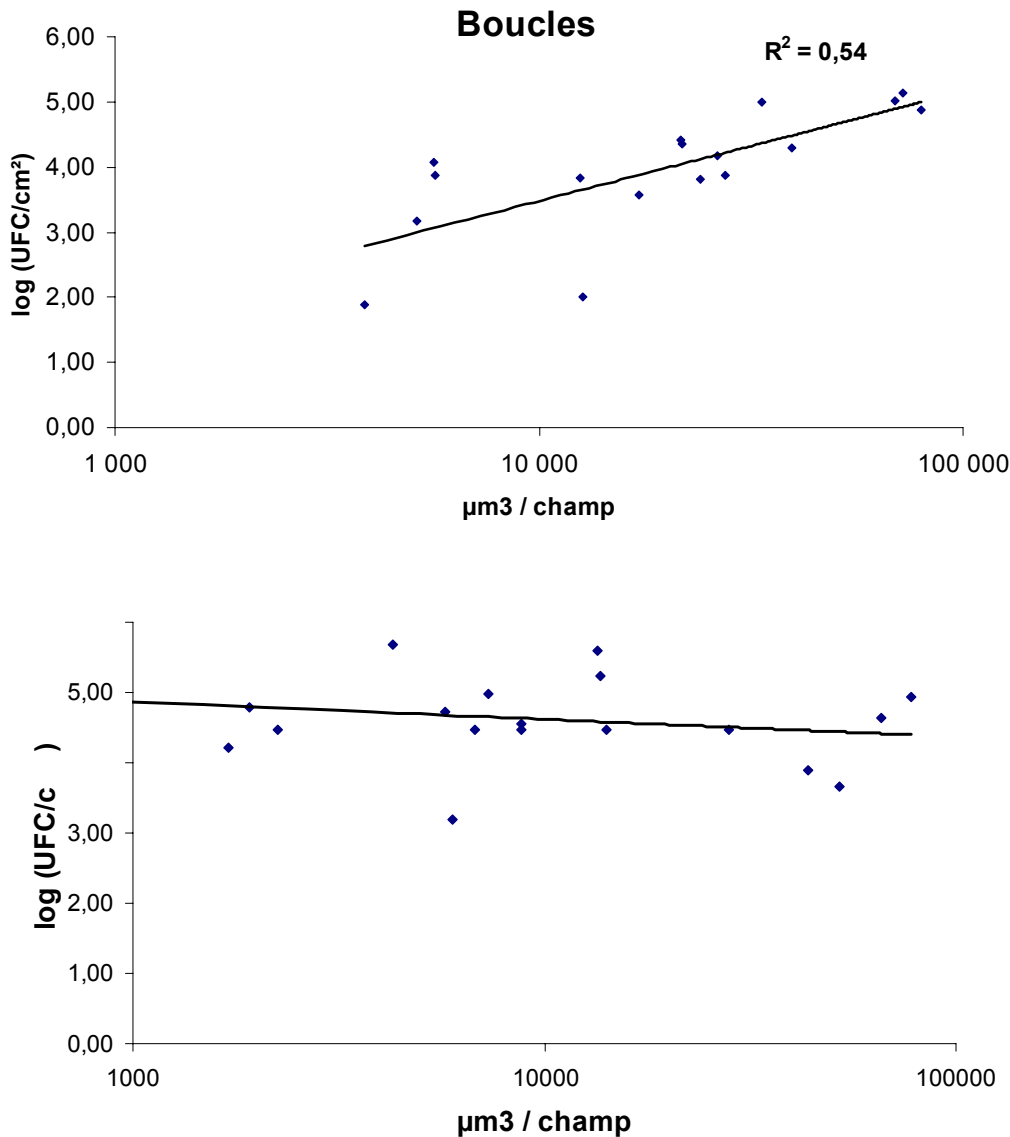
### III-4.2. Marquage LIVE/DEAD

Le marquage avec le kit *BacLight* LIVE/DEAD a été utilisé dans de nombreuses études afin d'évaluer l'intégrité membranaire, donc la viabilité des bactéries issues d'écosystèmes variés (Boulos *et al.* 1999; Auty *et al.* 2001; Hope *et al.* 2002). Dans les observations que nous avons pu réaliser, la différence de marquage "vivant" (syto-9, coloration verte) / "mort" (IP, coloration rouge) n'est pas toujours très nette : une partie de la biomasse apparaît souvent en jaune, coloration résultant d'un marquage simultané avec les deux intercalants de l'ADN (Fig. 54). Cette gamme de marquages est décrite dans la littérature (Boulos *et al.* 1999) mais la société commercialisant le kit (Molecular Probes) n'en fait pas mention. Elle peut être due notamment à l'existence de dommages membranaires mineurs induits par différents stress, non létaux pour les bactéries mais qui permettent la pénétration de faibles quantités d'IP (Terzieva *et al.* 1996). Des études préliminaires menées sur des coupons PVC prélevés sur les bras morts et incubés 12 h à 37°C dans de l'eau du robinet stérilisé additionnée de R2A dilué au 1/10 nous ont permis de lever le doute quant à la prise en compte de cette biomasse marquée en jaune dans la biomasse "vivante" ou dans la biomasse "morte". En effet les microcolonies apparues pendant l'incubation à 37°C, constituées de bactéries vivantes puisqu'en phase de réplication active, sont colorées par les deux marqueurs : par la suite la biomasse colorée en jaune a systématiquement été prise en compte dans la catégorie biomasse "vivante".



**Figure 54 : Marquage LIVE/DEAD d'un coupon PVC prélevé sur un bras mort et incubé 12 heures à 37°C dans du R2A dilué au 1/10 dans de l'eau du robinet stérilisée par filtration. A gauche : marquage syto-9, au centre : marquage IP, à droite : superposition.**

Afin d'évaluer la relation entre la quantité de biomasse vivante sur les coupons et les dénombrements réalisés à partir des biofilms des billes de verre, nous avons étudié la corrélation entre ces deux variables dans le cas des boucles principales et dans celui des bras morts (Fig. 55). Dans le cas des boucles le coefficient de corrélation est de 0,54, il est nettement plus élevé que dans le cas des bras morts pour lesquels la valeur n'est que de 0,05.



**Figure 55 : droites de corrélation entre la quantité de biomasse vivante sur les coupons PVC déterminée par analyse d'images, et les dénombrements sur gélose R2A à partir des biofilms prélevés sur billes de verre. Seuls les échantillons pour lesquels de la biomasse était quantifiable en analyse d'images ont été pris en compte.**

Le fait que les types de supports utilisés étaient différents, et que les conditions hydrodynamiques auxquelles étaient exposés ces supports sont elles aussi complètement différentes explique en partie ces différences dans les

coefficients de corrélation. Les coupons en PVC sont inclus dans la canalisation, ils sont donc soumis à un flux constant et à des forces de cisaillement importantes qui influent sur le développement du biofilm. Dans le cas des billes de verre ces forces sont complètement différentes, elles exercent sans doute des contraintes moins importantes sur les biofilms (Stoodley *et al.* 2002). De plus les bactéries se développant sur le verre sont métaboliquement moins actives que celles se développant sur PVC (Hallam *et al.* 2001), elles peuvent donc être moins sensibles à l'action des traitements de désinfection. Par ailleurs, dans les bras morts la bactéricidie du cuivre a sans doute aussi un rôle important dans les différences observées. Bien que les biofilms observés en marquage LIVE/DEAD soient développés sur coupons PVC, ils ont sûrement été exposés au cuivre provenant de la canalisation. Cette observation est rapportée par Rogers *et al.* : l'incubation de coupons de verre dans des canalisations construites dans différents types de matériaux se traduit par une colonisation du coupon en relation avec la colonisation de la canalisation elle-même. En l'occurrence, dans cette étude les lames de verre provenant de canalisations en cuivre étaient les moins colonisées (Rogers *et al.* 1994a). Par ailleurs le rinçage quotidien, se traduisant par un flux intense et bref dans la canalisation, a tendance à entraîner un détachement important des bactéries du biofilm (van der Kooij *et al.* 2002), sans doute plus important dans le cas des biofilms sur coupons PVC que dans celui des biofilms des billes de verre. Dans la boucle principale le flux est constant et a donc une influence continue se traduisant par le développement d'un biofilm susceptible d'atteindre un état d'équilibre qui peut expliquer la valeur nettement plus élevée que dans les bras morts du coefficient de corrélation.

Dans le cas des biofilms analysés sur les coupons en PVC provenant des boucles, les valeurs d'épaisseur moyenne et de biomasse par unité de surface calculées grâce au logiciel Comstat ( $2,9 \pm 1,0 \mu\text{m}$  et  $0,8 \pm 0,4 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ , respectivement) sont très proches de celles publiées récemment par Martiny *et al.* (2003). Ils ont étudié des biofilms sur coupons en acier inoxydable incubés dans une boucle de recirculation alimentée avec de l'eau potable, les valeurs calculées pour des biofilms âgés de 94 jours sont de  $4,6 \pm 1,8 \mu\text{m}$  pour l'épaisseur moyenne,  $1,6 \pm 0,8 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  pour la biomasse. Ce type de marquage associé à une observation en microscopie confocale permet d'appréhender des informations qui sont difficilement



accessibles autrement : observation des amibes sous forme de trophozoïtes (alors que dans les dénombrements ce sont majoritairement les kystes qui sont pris en compte car les trophozoïtes sont détruits lors des procédures de décrochage des biofilms), observation du passage d'une biomasse essentiellement vivante à une biomasse majoritairement morte dans le cas du traitement à la monochloramine (alors que dans le cas du dénombrement sur gélose cette évolution ne se traduit que par une diminution inférieure à 1 log).

### III-4.3. Marquage FISH

Les résultats de la FISH sur les biofilms provenant des canalisations en cuivre se sont révélés inexploitable, ne permettant pas d'appréhender la composition de la flore. Ces résultats peuvent être dus au manque de sensibilité de la technique appliquée à des bactéries présentant une activité métabolique réduite à cause du cuivre présent dans les canalisations. Cette observation est rapportée par Schwartz *et al.* (1998) qui n'ont pas pu appliquer la technique FISH à des biofilms cultivés dans des réseaux d'eau potable sur coupons de cuivre.

Les résultats obtenus sur les boucles principales sont très variables d'une boucle à l'autre, avec notamment une variation importante de la biomasse marquée par le témoin positif MixEUB338. Plusieurs études font état de la difficulté de réaliser des hybridations sur biofilms provenant de réseaux de distribution. Il semblerait notamment que plus les biofilms sont âgés, plus l'hybridation est difficile à réaliser (Schwartz *et al.* 1998; Martiny *et al.* 2003). Une procédure de revivification en milieu R2A + acide pipémidique, telle que celle que nous avons utilisé pour les incubateurs à billes de verre, aurait peut-être permis d'améliorer le signal obtenu.

Bien que très variables d'un circuit à l'autre, les proportions de biomasse hybridées avec les différentes sondes de groupes dans les boucles avant traitement sont proches de celles décrites dans d'autres études, dans lesquelles la prédominance importante des  $\beta$ -*Proteobacteria* dans les biofilms des réseaux d'eau potable est systématique (Kalmbach *et al.* 1997; Martiny *et al.* 2003; Schmeisser *et al.* 2003; Singh *et al.* 2003). Les résultats sont même parfois quasiment identiques malgré les différences dans les méthodologies employées. Dans notre étude, les billes de verre ont été exposées 120 jours et la biomasse a été hybridée avec des

sondes marquées en Cy5 et comparée à un contre-marquage en syto-9. Les proportions moyennes calculées à partir des résultats des 7 boucles sont de 45,5%, 3,7%, 27,6%, 3,6% et 0% pour les sondes MixEUB338, Alpha968, Bet42a, Gam42a et CF319a respectivement. Dans l'étude de Kalmbach les biofilms ont été prélevés à partir de coupons en verre insérés pendant 70 jours dans des canalisations de réseaux. Des sondes marquées en FLUOS ont été utilisées, tandis que la biomasse totale était visualisée par marquage au DAPI. Les différentes proportions calculées sont de 49%, 3%, 34%, 6% et 0% avec les sondes EUB338, Alf1b, Bet42a, Gam42a et CF319a. Une étude similaire a été réalisée par Schwartz *et al.* (1998) à partir de biofilms prélevés sur des coupons métalliques (acier) ou en plastique (PVC et polyéthylène haute densité) exposés pendant 4 jours dans des réseaux intérieurs. Les proportions des différentes classes de protéobactéries sont différentes, avec des quantités d'alpha- et gamma-protéobactéries plus importantes : 4 à 23% et 27 à 41% respectivement en fonction du support utilisé, tandis que les bêta- protéobactéries représentent 33 à 42% de la flore. Comparant leurs résultats à ceux de Kalmbach *et al.*, les auteurs suggèrent que les différences observées sont dues à la nature de l'eau utilisée comme source pour la production de l'eau potable. Dans leur étude il s'agit d'eau de rivière infiltrée tandis que dans l'étude de Kalmbach il s'agit d'eau souterraine. Dans notre étude l'eau alimentant l'usine de production d'eau potable est de l'eau de rivière (Seine) infiltrée. Nos résultats sont pourtant proches de ceux de Kalmbach. Plus que la nature de l'eau brute alimentant l'usine de potabilisation, il est probable que l'âge du biofilm et la nature des matériaux utilisés comme supports soient plus déterminants dans la composition de la flore des biofilms.

La somme des pourcentages des biomasses marquées avec les sondes spécifiques de groupes est souvent inférieure au pourcentage de biomasse hybridée par MixEUB338 (Tab. XIII). La présence de groupes bactériens non hybridés par le panel de sondes utilisé ne peut pas être exclue, cependant les études menées sur la composition des biofilms de réseaux d'eau potable avec des outils d'analyse différents (clonage, séquençage) décrivent aussi une large prédominance des protéobactéries, et notamment des bêta-protéobactéries (Schmeisser *et al.* 2003). Il est donc plus probable que les différences observées sont dues à une variation dans la qualité des marquages par les sondes et à la méthode d'analyse d'images.

### III-4.4. Analyse d'images

Les procédures d'analyse d'images développées sont très fastidieuses, elles ne permettent que le traitement d'un nombre limité d'échantillons. Ceci explique notamment les écarts-types importants sur les résultats des deux types de marquages. La première limitation de la technique est la nécessité d'acquisition d'un nombre élevé d'images. Bien qu'il y ait une stabilisation des écarts-types pour 12 champs analysés en FISH, les bactéries sont parfois réparties de façon hétérogène dans l'échantillon (Fig.45B : amas de bactéries hybridées au milieu du champ), ce type d'échantillons nécessiterait sans doute l'acquisition d'un nombre plus important de champs. Dans le cas du marquage de viabilité, seulement 4 piles d'images ont été acquises par coupon. Bien que cela représente un nombre de champs très réduit, le nombre d'images en résultant est élevé : une trentaine ( $\times 2$  colorations=60) par pile pour des biofilms dont l'épaisseur maximale est généralement aux alentours de 30  $\mu\text{m}$ .

L'utilisation de plusieurs logiciels successifs, les contraintes imposées par certains de ces logiciels (nécessité de renommer les images pour les rendre compatibles avec Comstat), rendent la procédure très lourde en termes de manipulations informatiques. La solution consiste en une automatisation complète de la chaîne d'analyse : acquisition automatisée par le microscope (Kuehn *et al.* 1998), développement de logiciels spécifiques pour ce type d'analyses (Xavier *et al.* 2003). La limite essentielle dans le développement de ces outils consiste aujourd'hui dans la détermination automatique du seuil de positivité du signal fluorescent : bien qu'un certain nombre d'algorithmes existent, aucun ne semble réunir de consensus (Xavier *et al.* 2001; Yang *et al.* 2001; Baveye 2002). La détermination du seuil de positivité par le manipulateur est, quant à elle, relativement suggestive (Webb *et al.* 2003), menant à une variation inter-laboratoires importante.

### III-5. CONCLUSION

Aucun des désinfectants étudiés n'est parvenu à éradiquer définitivement *L. pneumophila* des canalisations contaminées, qui sont rapidement re-colonisées après interruption des traitements. La membrane d'ultrafiltration installée en entrée

de circuit n'a pas pu prévenir cette re-colonisation, ce qui démontre clairement l'inutilité d'installer de tels dispositifs en entrée de réseaux contaminés, même si la contamination est "masquée" par un traitement efficace. Cette capacité de re-colonisation rapide démontre aussi l'intérêt limité des traitements chocs s'ils ne sont pas suivis immédiatement par la mise en place d'un traitement continu efficace (Steinert *et al.* 1998). Par ailleurs le dosage précis et continu des résiduels de désinfectant, ainsi que la diffusion de ces produits dans tout le réseau, sont des points critiques afin d'éviter toute interruption du traitement. Dans notre étude le dioxyde de chlore est le seul traitement qui a permis une action dans les bras morts à condition que la totalité de l'eau de ces bras morts soit renouvelée quotidiennement, prouvant la nécessité d'un rinçage fréquent des canalisations des réseaux intérieurs. L'efficacité de la monochloramine aux doses recommandées n'a pas pu être évaluée, des études avec un mode de préparation différent du produit doivent être envisagées.

# CHAPITRE III

## 3<sup>ème</sup> Partie

### Auto-inducteurs

## **I- CONTEXTE DE L'ETUDE**

Cette étude a débuté en 2000, alors que le séquençage du génome de *L. pneumophila* en était encore à ses débuts (démarrage : 1999). Depuis, le séquençage est quasiment arrivé à son terme et les alignements réalisés avec des séquences codant pour des protéines impliquées dans les cascades de régulation AI-1 et AI-2 ont donné des résultats significatifs pour plusieurs protéines (Annexe IV) : protéine HdtS impliquée dans la synthèse d'AI-1 chez *P. fluorescens* (Laue *et al.* 2000), nombreuses protéines LuxR impliquées dans la régulation de l'expression des gènes suite à la fixation des AI-1, LuxQ, LuxN, LuxU et LuxO impliqués dans la cascade de régulation via les AI-1 et AI-2 chez *V. harveyi*. Par ailleurs plusieurs publications mentionnent l'éventualité de l'existence de ces systèmes de régulation chez *L. pneumophila* : Fields notamment, dans le chapitre consacré à la "Vie sociale de *L. pneumophila*" dans le recueil des résumés de conférences du congrès qui a eu lieu à Ulm en 2002, fait part de cette possibilité (Fields 2002). Des équipes de recherche travaillent sur le sujet ([www.kuleuven.ac.be/bacteriology/Legionella.html](http://www.kuleuven.ac.be/bacteriology/Legionella.html)), preuve de l'intérêt de la communauté scientifique pour cette thématique. C'est dans ce contexte que nous avons décidé de mener des expérimentations afin de déterminer si *L. pneumophila* sécrète et/ou est sensible à l'action des AI-1 et des AI-2.

## **II- AUTO-INDUCTEURS DE TYPE 1**

### **II-1. SELECTION DES SOUCHES DE *L. PNEUMOPHILA* TESTEES**

La sélection des souches de *L. pneumophila* testées pour la détection des AI-1 a été réalisée suite à l'observation des cinétiques de croissance en bouillon BCYE (Fig. 56). Trois essais ont été réalisés, avec des profils de courbes similaires à chaque fois, mais la croissance retardée survenue dans certains essais n'a pas permis de réaliser des moyennes inter-essais des valeurs d'absorbance. Après 9 jours de croissance, certaines courbes présentent une allure semblable (Versailles 2-I, Paris 2-V et Lyon L2-I) d'autres au contraire différente (Nancy 22-I, Paris GP, Lyon H2-II, Lyon H9-II). En fonction de ces courbes, les souches Lyon H9-II, Lyon H2-II, Paris GP, Nancy 22-I et Versailles 2-I ont été choisies pour les tests de détection des AI-1.

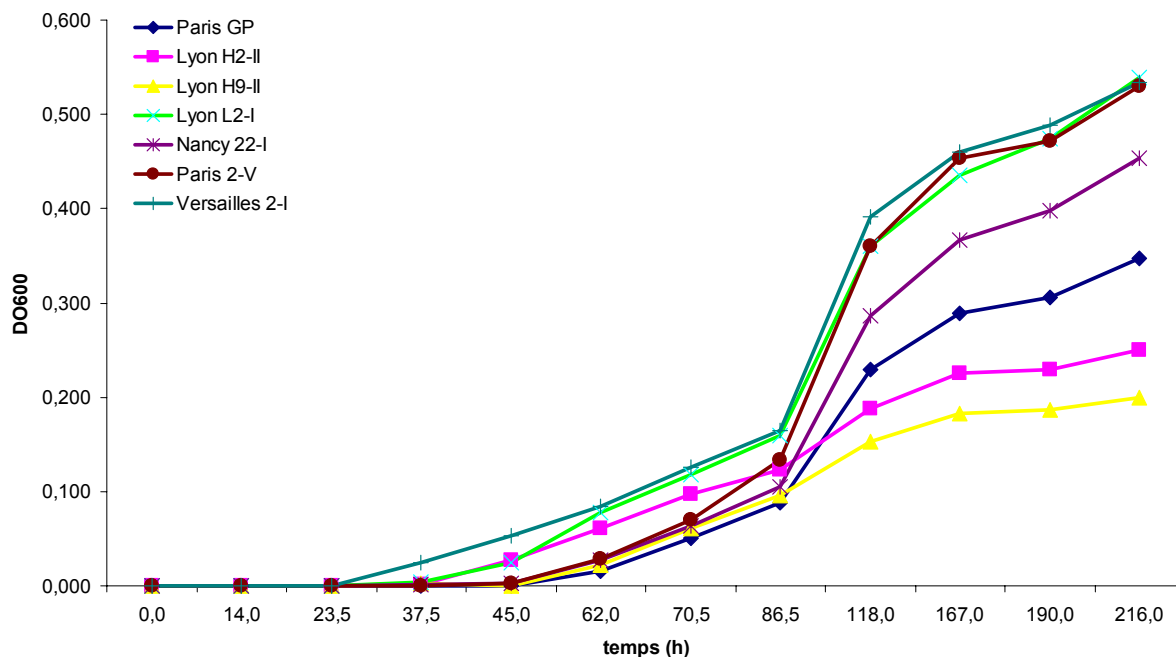


Figure 56 : courbes de croissance des différentes souches cultivées en bouillon BCYE (graphique représentatif de 3 essais).

## II-2. MISE AU POINT DE LA METHODE D'EXTRACTION

### II-2.1. Allure des chromatogrammes

Les chromatogrammes sont difficilement interprétables (Fig. 57). En effet la complexité des courbes obtenues par suivi de l'absorbance à 210 nm rend impossible la détection d'un composé actif parmi les autres composés. Ceci est notamment mis en évidence lorsque l'on superpose le chromatogramme obtenu par injection directe de l'AHL purifiée avec le chromatogramme obtenu par injection du solvant acétate d'éthyle seul (Fig. 57A) : le pic du solvant recouvre en grande partie les fractions 1 et 2, masquant ainsi les pics d'éventuels composés actifs.

On notera simplement l'existence d'un composé dans la fraction 5 du BCYE qui est dégradé par toutes les espèces bactériennes testées, pour donner naissance à un composé dans la fraction 6. Par ailleurs la plupart des composés sont retenus par la cartouche C18 mais la cartouche DVB permet tout de même de récupérer des molécules qui n'ont pas été retenues par la C18.

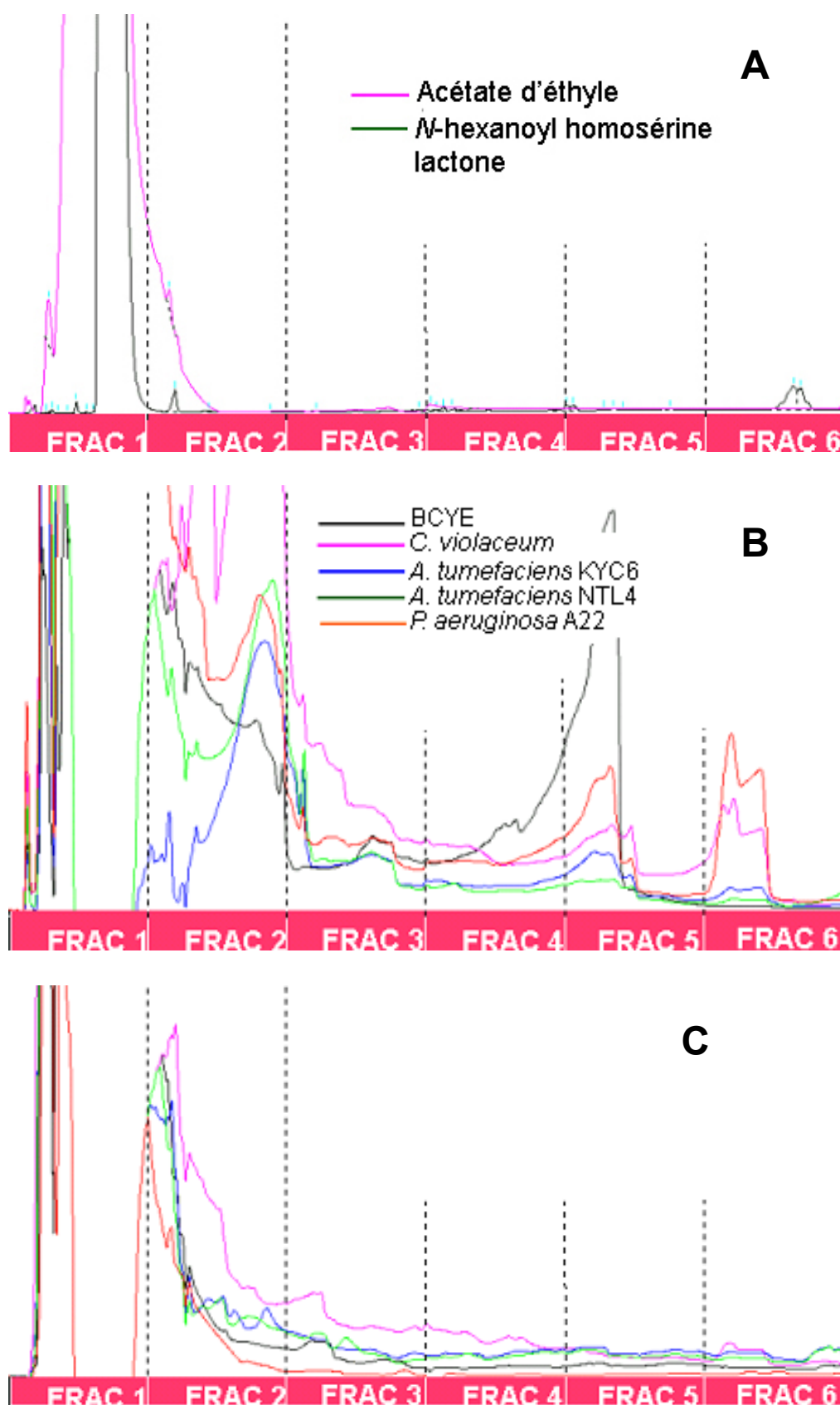


Figure 57 : Allure des chromatogrammes obtenus par injection et élution du solvant seul ou du solvant additionné d'AHL (A), des extraits des différents surnageants de culture sur cartouche C18 (B) et DVB (C) en série.



## II-2.2. Tests de détection des AHLs

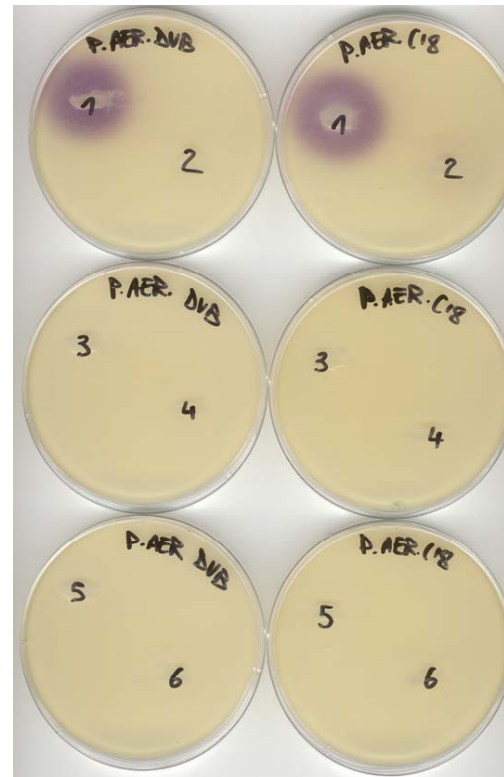
### II-2.2.1. Avec la souche rapporteur *C. violaceum*

Les résultats obtenus sont conformes à ce qui était attendu (Fig. 58)

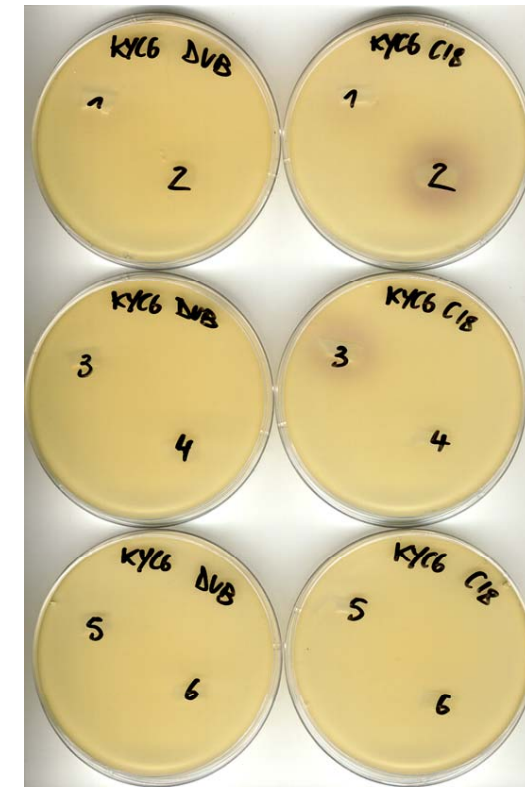
- la *N*-hexanoyl homosérine lactone injectée à 10  $\mu$ M dans 500 ml de BCYE stérile est retrouvée dans les fractions n° 1 & 2 qui entraînent de manière très nette une synthèse de violacéine par *C. violaceum* 026. Cette expérience n'a été réalisée que sur cartouche C18, et seulement avec cette souche rapporteur car nous ne disposons que de peu de produit.
- la souche *P. aeruginosa* A22 présente une fraction n°1 active, aussi bien sur l'éluat provenant de la cartouche C18 que sur celui correspondant à la cartouche DVB, ce qui prouve la nécessité d'utiliser ces 2 cartouches en série. Cette activité correspond sans doute à la *N*-butanoyl homosérine lactone habituellement sécrétée par cette espèce.
- la souche *A. tumefaciens* KYC6 présente deux fractions légèrement actives provenant de la cartouche C18 : les n° 2 et 3. Aucune activité n'est décelée sur les fractions provenant de la cartouche DVB. La production de 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C6-HSL, et C6-HSL par cette souche a été rapportée dans la littérature. La souche Cv 026 étant essentiellement sensible aux AHLs à chaîne courte, les 2 fractions détectées pourraient correspondre à la 3-oxo-C6-HSL et à la C6-HSL.
- le BCYE stérile seul et les extraits de surnageant de culture des souches *C. violaceum* 026 et *A. tumefaciens* NTL4 ne déclenchent aucune synthèse de violacéine par la souche rapporteur.



*N*-hexanoyl homosérine lactone à 10  $\mu$ M dans 500 mL de bouillon BCYE, extraction sur cartouche C18 (puits du haut : LB stérile, du bas : fraction testée)



*P. aeruginosa* A22 cultivé dans 1 L de bouillon BCYE, extraction sur cartouches C18 (gélules à droite) et DVB (gélules à gauche) en série



*A. tumefaciens* KYC6 cultivée dans 1 L de bouillon AT, extraction sur cartouches C18 (gélules à droite) et DVB (gélules à gauche) en série

**Figure 58 : Résultats des tests d'activation de la synthèse de violacéine par *C. violaceum* 026 en présence des différentes fractions HPLC des extraits témoins.**

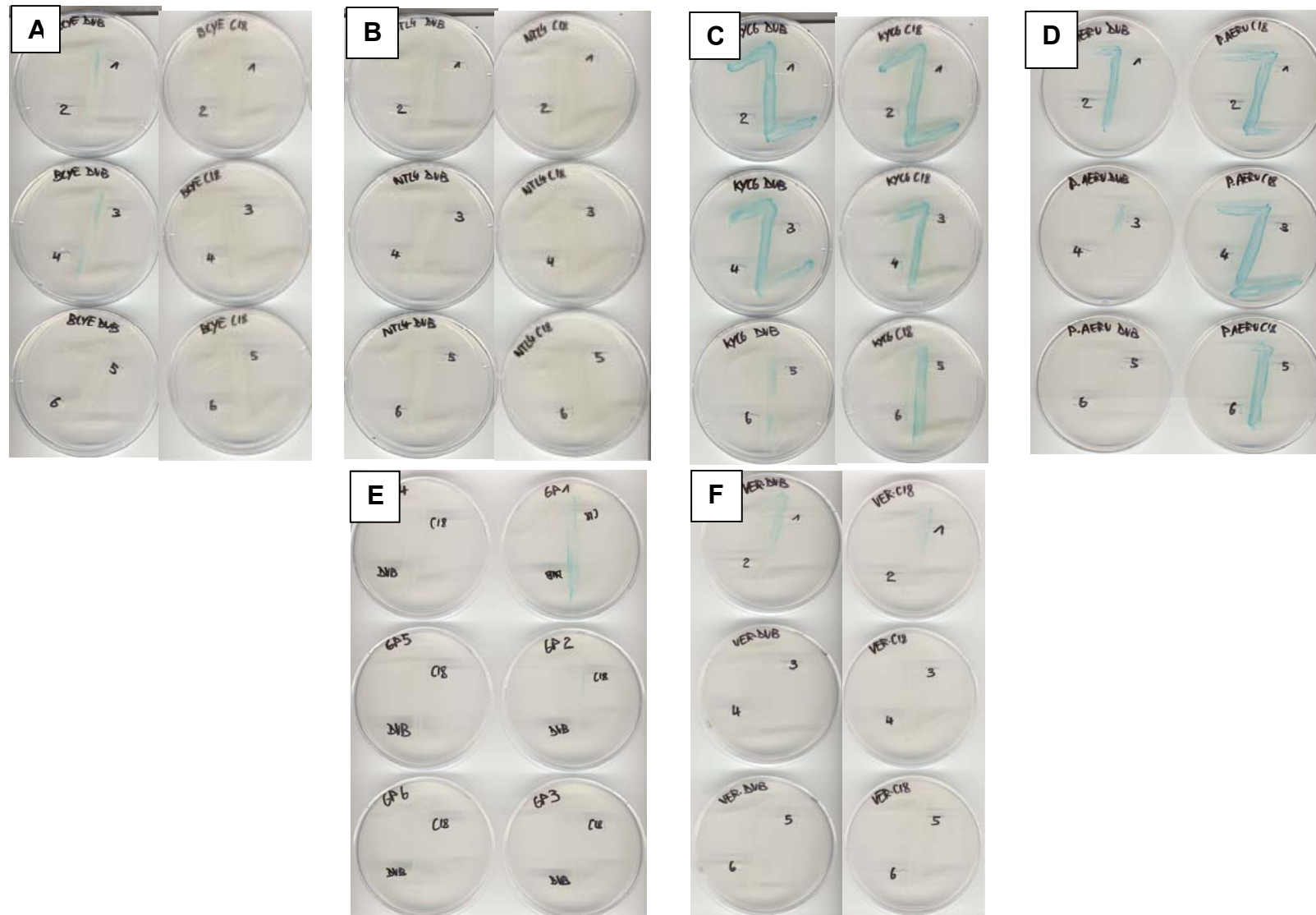


Figure 59 : Résultats des tests d'activation de la  $\beta$ -galactosidase de *A. tumefaciens* NTL4 en présence des différentes fractions HPLC. Témoins négatifs : BCYE stérile (A), *A. tumefaciens* NTL4 cultivé en bouillon AT (B). Témoins positifs : *A. tumefaciens* KYC6 cultivé en bouillon AT (C) et *P. aeruginosa* A22 cultivé en BCYE. *L. pneumophila* : souches Paris (E) et Versailles 2-1 cultivées en bouillon BCYE.

### II-2.2.2. Avec la souche rapporteur *A. tumefaciens* NTL4

Les résultats obtenus avec cette souche sont plus délicats à interpréter (Fig. 59) :

- Le BCYE stérile seul entraîne une légère activation de la souche rapporteur pour les fractions 1, 3 et 4 récupérées à partir de la cartouche DVB. Cette activation n'est pas retrouvée sur les fractions provenant de la cartouche C18.
- Le surnageant de culture de la souche *A. tumefaciens* NTL4 n'entraîne pas d'activation.
- Les 6 fractions issues du surnageant de culture de la souche *A. tumefaciens* KYC6 extrait sur cartouche C18 entraînent une activation, ainsi que les fractions 1, 2, 3 et 4 provenant de la cartouche DVB. L'activation par les fractions 5 et 6 issues de la cartouche DVB est beaucoup plus discrète.
- Les 6 fractions issues du surnageant de culture de la souche *P. aeruginosa* A22 extrait sur cartouche C18 entraînent une activation, seulement les fractions 1 et 2 et dans une moindre mesure 3 provenant de la cartouche DVB. Cette activation est sans doute due aux deux types d'homosérine lactones sécrétées par cette espèce : *N*-butanoyl et *N*-(3-oxododecanoyl) homosérine lactones.

## II-3. TEST DES SOUCHES DE *L. PNEUMOPHILA*

Aucun des extraits de surnageants de culture de *L. pneumophila* en bouillon BCYE n'a induit la synthèse de violacéine par *C. violaceum*. Par ailleurs aucun des extraits bruts n'a inhibé la synthèse de violacéine en présence de 500 nM de 3-oxo-*N*-hexanoyl-L-homosérine lactone. Concernant l'induction de l'activité  $\beta$ -galactosidase de *A. tumefaciens* NTL4, nous avons observé une faible induction par les fractions n°1 issues des extraits sur les cartouches C18 et DVB. (Fig. 59 E&F). L'intensité de la coloration est faible, peu différente de celle détectée dans le cas du BCYE stérile seul. Cependant dans le cas du BCYE stérile, seule la fraction n°1 issue de la cartouche DVB induit cette coloration, pas celle issue de la cartouche C18.

### III- AUTO-INDUCTEURS DE TYPE 2

#### III-1. CROISSANCE DE *L. PNEUMOPHILA* EN MILIEU NUTRITIF

Les surnageants de culture de la souche *L. pneumophila* Paris cultivée dans les 3 types de bouillon : BCYE, BCYE + 0,5% de glucose, et BCYE + 1 mM d'acide borique n'ont jamais induit la production d'une luminescence par la souche *V. harveyi* BB170, contrairement aux surnageants de culture des témoins positifs *V. harveyi* BB120 et BB152 qui induisent une luminescence maximale après 5 à 6 heures d'incubation (Fig. 60). Après 6 heures d'incubation, la croissance importante de la souche rapporteur *V. harveyi* BB170 entraîne une production d'AI-2 et une auto-induction de la luminescence qui masque l'induction exogène.

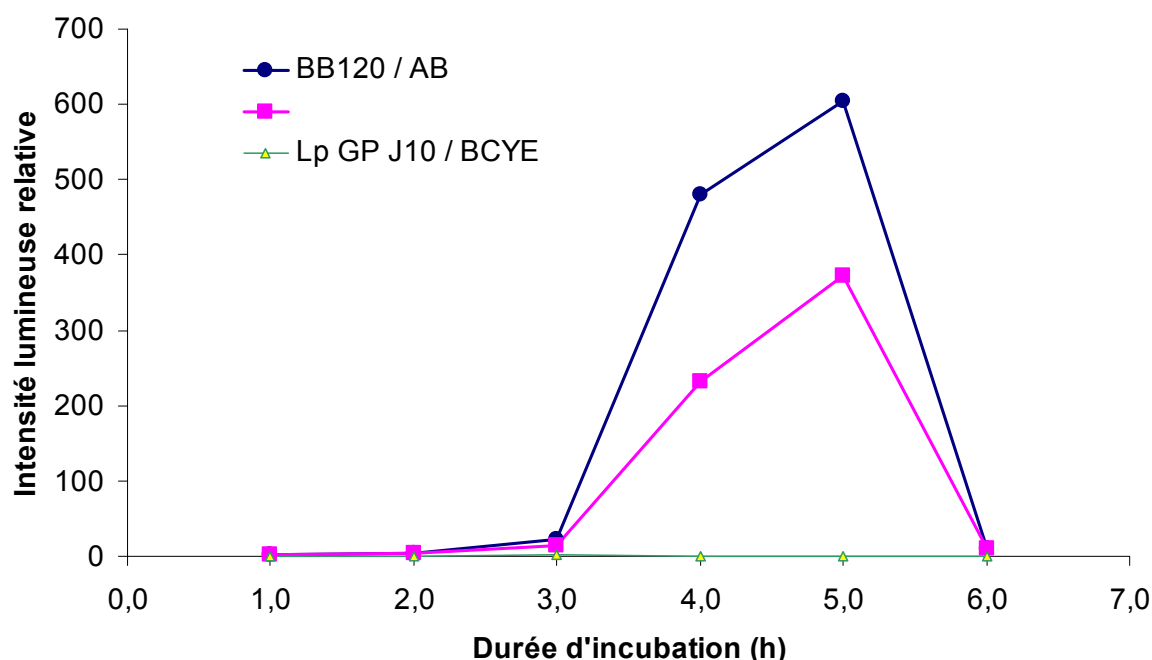


Figure 60 : Evolution des rapports des luminescences de *V. harveyi* BB170 induites par les surnageants de culture de *V. harveyi* BB120 et BB152 par rapport à celle induite par le milieu de culture stérile AB, et par le surnageant de culture de la souche *L. pneumophila* Paris cultivée en bouillon BCYE (J10) par rapport au bouillon BCYE stérile.

#### III-2. CROISSANCE DE *L. PNEUMOPHILA* DANS LES AMIBES

La croissance de *L. pneumophila* dans les amibes a été mesurée pendant 5 jours (Fig. 61). Le premier dénombrement mesure la quantité de légionelles ayant pénétré dans les amibes. Après seulement 16 heures de croissance intra-amibienne, la quantité de légionelles augmente quasiment d'un facteur 100, tandis qu'après 48

heures la croissance atteint un facteur 1000. Les quantités dénombrées diminuent par la suite, avec une perte de 1,5 log après 5 jours d'incubation.

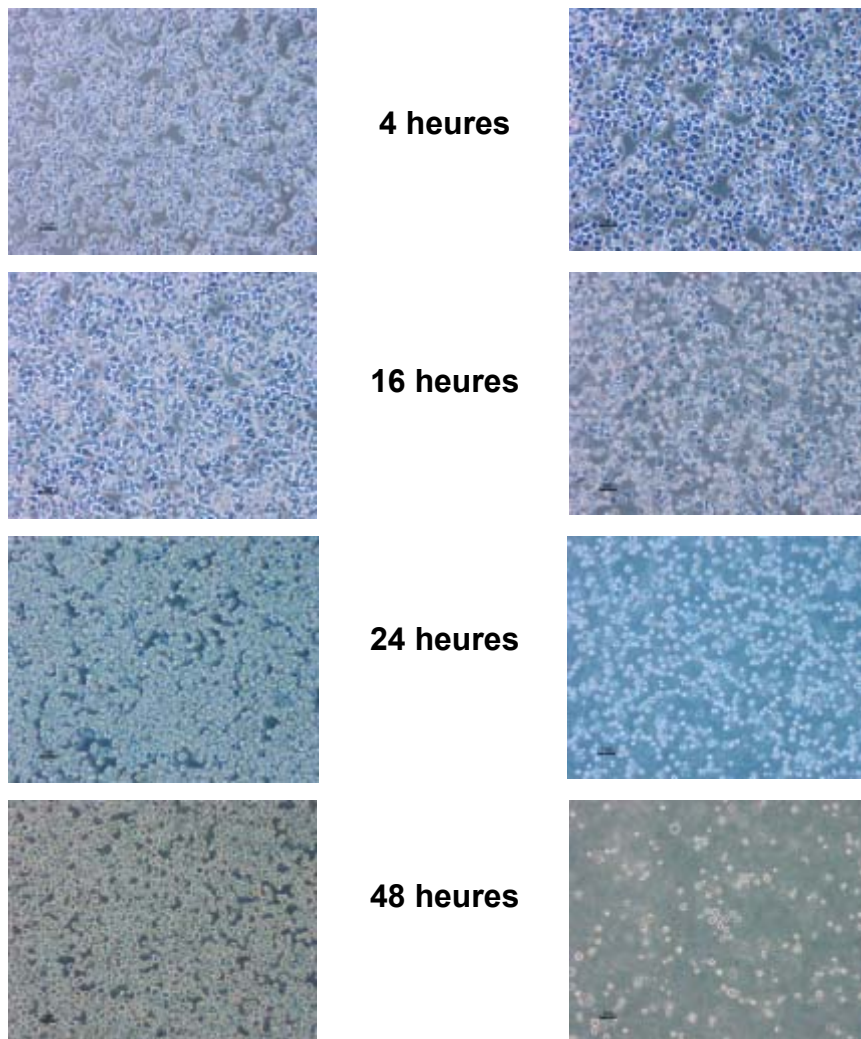
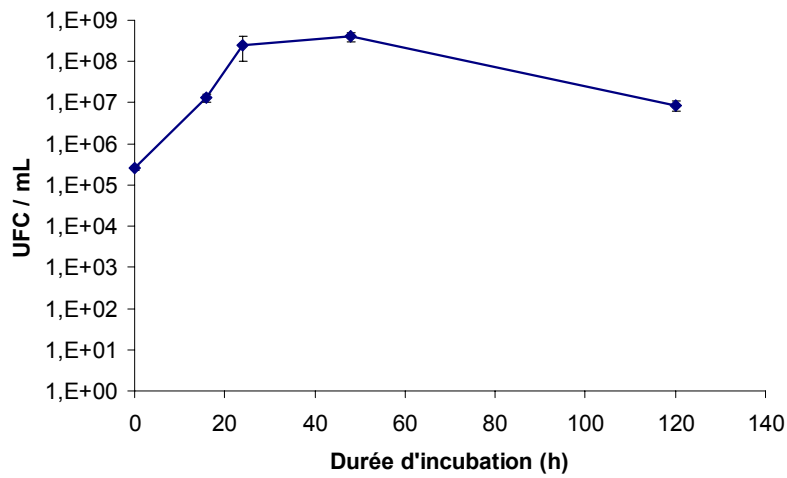


Figure 61 : Suivi de la croissance de *L. pneumophila* souche Paris dans *A. castellanii* ATCC30010. En haut : dénombrements des légionelles sur géluse BCYE (n=2 essais). En bas : évolution de l'aspect de la couche cellulaire d'amibes. Grossissement x200 (barre : 50µm).



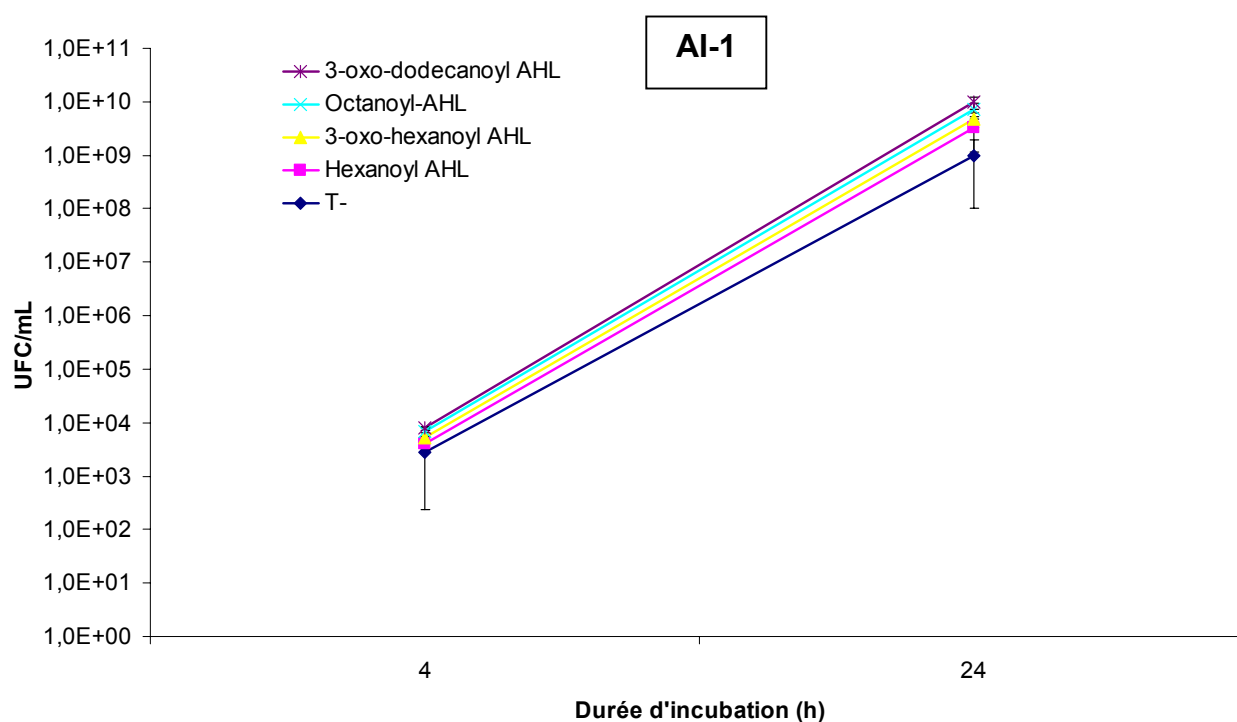
De la même façon que pour les surnageants de culture en bouillons, les surnageants de culture intra-amibienne testés n'ont pas induit la luminescence de *V. harveyi* BB170.

## IV- INFLUENCE DES AUTO-INDUCTEURS EXOGENES SUR LA MULTIPLICATION INTRA-AMIBIENNE DE *L. PNEUMOPHILA*

### IV-1. INCUBATION AVEC LES AUTO-INDUCTEURS

Les dénombrements sur géloses BCYE avant et après incubation de *L. pneumophila* avec les AI-1 et les surnageants de culture de *V. harveyi* BB152 montrent qu'il n'y a pas d'effet de l'incubation sur la quantité de légionelles dénombrées (données non présentées).

Les dénombrements réalisés à 4 heures et à 24 heures après l'invasion montrent que l'incubation n'a pas non plus d'influence sur la capacité des légionelles à envahir et à se multiplier dans les amibes (Fig. 62).



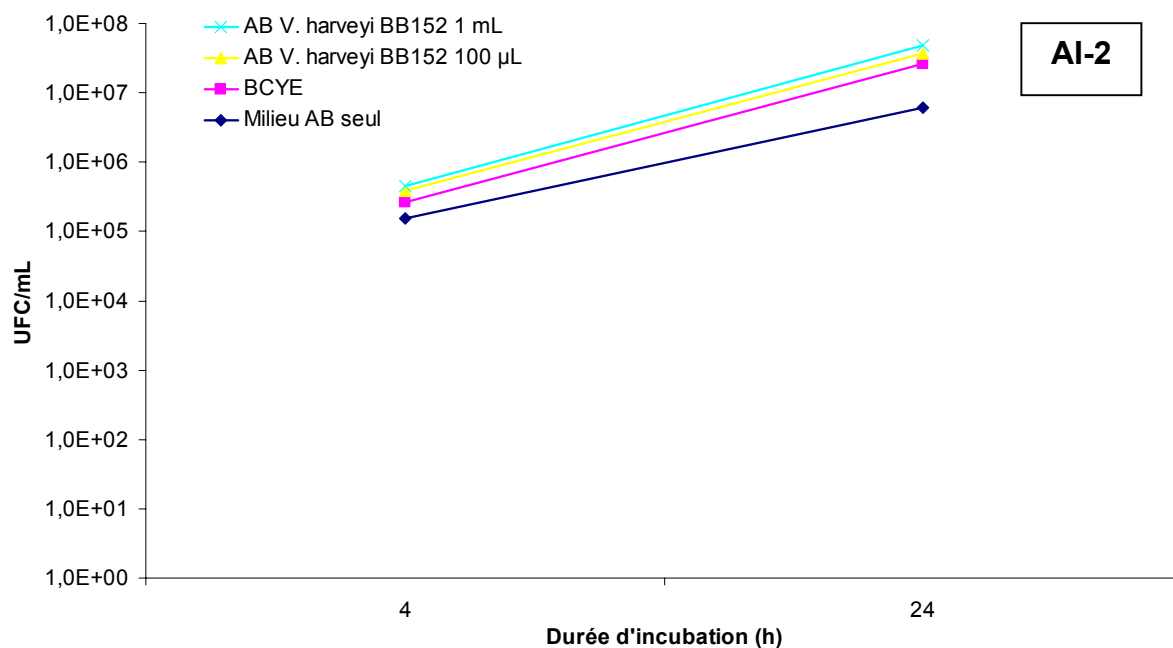


Figure 62 : Effet de l'incubation *L. pneumophila* JR 32 (pBC(*gfp*)-*Pmip*) avec 50 µM d'AI-1 ou du surnageant de culture de la souche *Vibrio harveyi* BB152 (AI-2) sur l'inféctivité vis-à-vis des amibes et la croissance intra-amibienne (n=2 essais).

## IV-2. OBSERVATION DE LA CROISSANCE INTRA-AMIBIENNE

L'utilisation de la souche JR 32 (pBC(*gfp*)-*Pmip*) nous a permis de visualiser clairement *L. pneumophila* lors des différentes étapes de la croissance intra-amibienne. La plupart des étapes décrites dans la littérature ont pu être observées (Fig. 63) : entrée dans l'amibe (2 et 4 h), localisation dans la vésicule de phagocytose (6 h), multiplication avec envahissement progressif de tout l'espace cellulaire (12 et 18 h), lyse de l'amibe et libération d'un nombre très important de *L. pneumophila* petites et très mobiles (24 h).



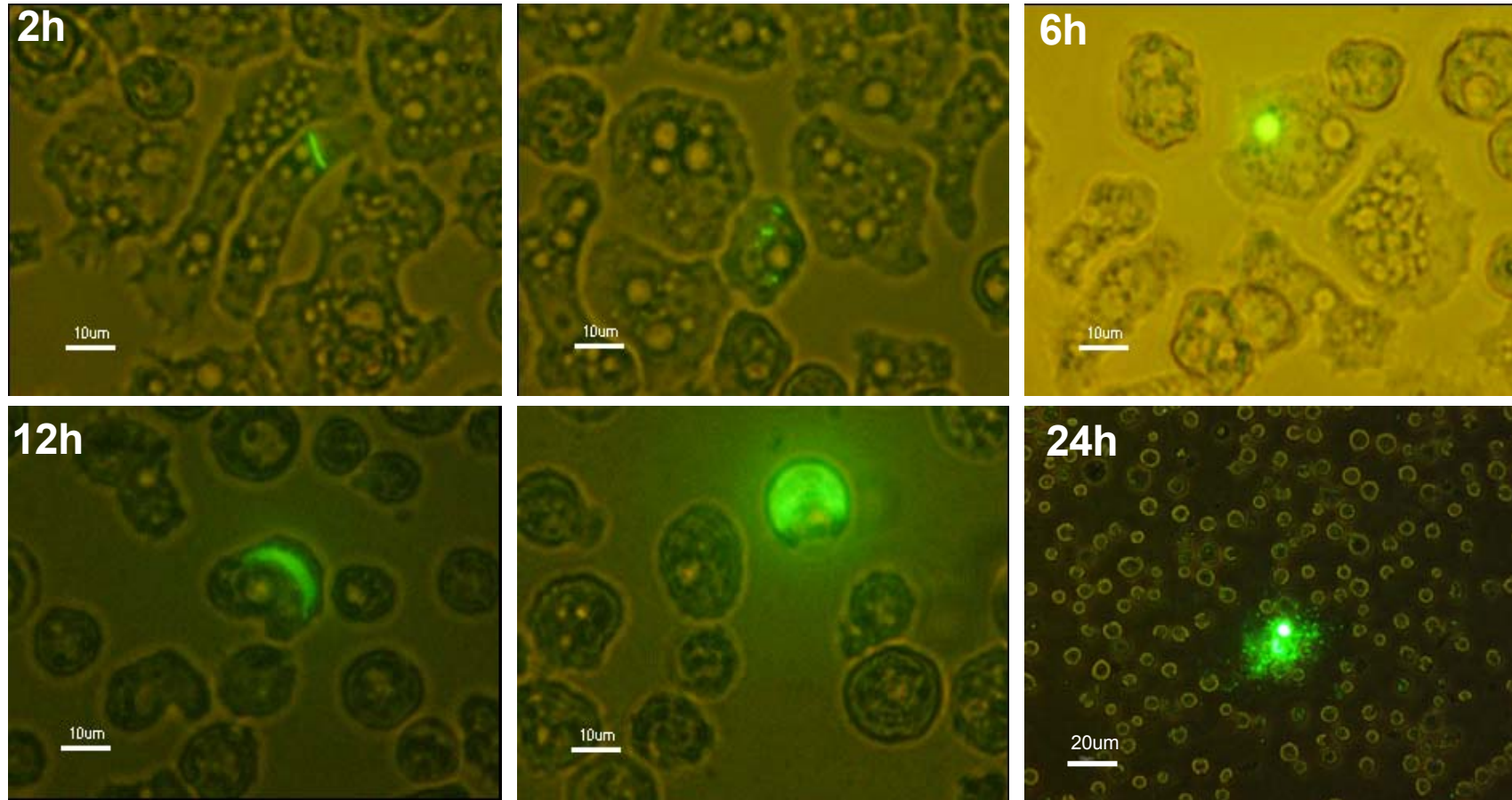


Figure 63 : Différentes étapes de la croissance intra-amibienne de *L. pneumophila* JR 32 (pBC(gfp)-Pmip) observées en microscopie à épifluorescence.

## V- DISCUSSION

*L. pneumophila* est un bacille Gram négatif appartenant au groupe des gamma-protéobactéries. De nombreuses espèces appartenant à ce même groupe possèdent les gènes codant pour la synthèse d'auto-inducteurs de type 1 ou 2 impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes (Ravn *et al.* 2001; Taga *et al.* 2003), par ailleurs les auto-inducteurs de type 1 jouent un rôle important dans les pneumonies à *P. aeruginosa* en contribuant à la persistance de l'infection et en influençant la réponse immunitaire (Smith *et al.* 2002; Wu *et al.* 2004). Les alignements de séquences réalisés sur le génome en cours de séquençage de *L. pneumophila* permettant de penser que de tels systèmes pourraient exister chez cette espèce, les méthodes de détection de ces molécules ont été appliquées à plusieurs souches de *L. pneumophila* séro-groupe 1 cultivées dans différentes conditions. Parmi ces souches figure notamment la souche Paris, dont l'importance en clinique est connue (Lawrence *et al.* 1999).

Aucune des expériences réalisées ne permet de conclure à l'existence de molécules d'auto-inducteurs sécrétées par les souches de *L. pneumophila* testées. L'utilisation du fractionnement HPLC afin de lever l'inhibition d'une AHL à chaîne courte par une AHL à chaîne longue, telle que celle décrite dans le cas de HdtS codant pour trois AHL différentes chez *P. fluorescens* (Laue *et al.* 2000), n'a pas permis la purification d'une molécule capable d'activer l'une des deux souches rapporteurs des AI-1. Nous n'avons pas testé la production d'auto-inducteurs de type 1 dans le cas d'une croissance intra-amibienne, cette expérience reste à réaliser. Par ailleurs les souches utilisées ne permettent pas la détection de tous les types d-AI-1 identifiés : jusque récemment les molécules présentant une chaîne carbonée très longue (C16) ne pouvaient être détectées que par utilisation de méthodes de marquage radioactif (Schaefer *et al.* 2002), cependant la mise au point d'une souche d'*A. tumefaciens* sur-exprimant le récepteur TraR aux AHLs par Zhu *et al.* permet d'envisager de nouveaux tests beaucoup plus sensibles (Zhu *et al.* 2003). Dans le cadre de ces études, l'extraction des surnageants sur cartouches C18 et DVB offre une alternative satisfaisante en termes de facilité de mise en œuvre et de sécurité à l'extraction liquide-liquide à l'aide du dichlorométhane. Par ailleurs l'utilisation de

cartouches remplies d'un co-polymère de DVB et de *N*-vinyl pyrrolidine a aussi été décrite récemment (Yao *et al.* 2002).

La sécrétion d'AI-2 n'a pas non plus été mise en évidence, quel que soit le milieu de culture utilisé : BCYE avec ou sans glucose. L'addition d'acide borique dans le milieu, servant de substrat pour la synthèse des AI-2, permet une augmentation significative de la synthèse d'AI-2 pour certaines espèces (Chen *et al.* 2002) : ce n'est pas le cas dans nos essais. Par ailleurs la synthèse d'AI-2 n'est pas non plus observée lors de la croissance intra-amibienne. Le pH des surnageants testés a été vérifié car les pH acides inactivent la production de la luminescence par *V. harveyi* BB170 (DeKeersmaecker *et al.* 2003) : ces pH ont toujours été compris entre 6,7 et 6,8, ils sont donc compatibles avec le test. Il semblerait cependant que LuxS soit capable de coder pour la synthèse d'un autre type de molécule : les AI-3, qui ne sont pas détectées par *V. harveyi* (Sperandio *et al.* 2003).

# CHAPITRE IV

## Conclusions et perspectives

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La contamination des réseaux intérieurs de distribution d'eau potable froide ou chaude par des micro-organismes pathogènes constitue un problème de santé publique notamment dans les établissements recevant du public et particulièrement dans les établissements de soins. Elle engage la responsabilité des producteurs d'eau potable qui doivent garantir, selon la nouvelle réglementation, la conformité de l'eau au robinet du consommateur, et celle des propriétaires et des gestionnaires responsables des réseaux intérieurs. Parmi les espèces bactériennes impliquées, *L. pneumophila* présente une écologie particulière en raison, d'une part de sa thermophilie, mais aussi de sa multiplication intra-cellulaire lui permettant de proliférer rapidement dans des proportions importantes et lui offrant une protection efficace contre les traitements de désinfection mis en œuvre.

L'objectif du travail réalisé est d'appréhender plusieurs aspects de l'écologie de *L. pneumophila* et de la flore microbienne environnante dans des circuits d'eau chaude alimentés en eau destinée à la consommation humaine. Le suivi au cours du temps de la colonisation d'un réseau intérieur non traité a permis l'étude des variations de populations dans l'eau et les biofilms des circuits d'eaux chaude et froide, afin de mettre en évidence d'éventuels paramètres favorisant la prolifération des légionelles et d'évaluer la pertinence de moyens de détection autres que la méthode AFNOR. Les essais réalisés sur un circuit pilote reproduisant un réseau de distribution ont permis d'évaluer l'efficacité des principaux types de traitements de désinfection sur *L. pneumophila*, la flore totale et les amibes dans des conditions identiques de mise en œuvre. Par ailleurs, dans le cadre de l'étude des relations entre les espèces constituant ces écosystèmes, nous avons cherché à mettre en évidence une croissance de *L. pneumophila* dans des biofilms dépourvus de protozoaires mais constitués d'espèces décrites comme potentialisatrices des légionelles par sécrétion de métabolites qui leur sont essentiels. Enfin, des essais ont été réalisés pour détecter des molécules auto-inductrices éventuellement sécrétées par *L. pneumophila* et qui pourraient réguler l'expression des gènes de la bactérie en fonction de l'environnement et de la phase de croissance dans lesquels elle se trouve.

## 1 - Conclusions

### 1-a. Ecologie de *L. pneumophila* sur site

Les systèmes originaux de prélèvement implantés dans le réseau permettent un échantillonnage simple et rapide de l'eau et des biofilms. Ils amplifient considérablement la quantité de légionelles, sans doute grâce au développement local important de biofilm servant de support à la prolifération d'amibes contaminées. Cette amplification a permis la culture des légionelles à partir des biofilms prélevés en eau froide et le typage moléculaire a confirmé qu'il s'agissait de la même souche que celle retrouvée en eau chaude, qui a par ailleurs été la seule souche retrouvée sur le site étudié pendant toute la durée de l'étude. L'hypothèse d'une contamination du réseau intérieur par l'eau distribuée est donc plausible. Mis à part la température, les paramètres physico-chimiques relevés sont restés relativement constants et ne permettent donc pas d'expliquer les variations observées dans les dénombrements. La méthode FISH, malgré les optimisations réalisées au cours de l'étude, s'est révélée peu sensible pour la détection spécifique de *L. pneumophila*, son utilisation dans les conditions décrites n'améliore pas le diagnostic des installations et les images observées après hybridation sont parfois difficiles à interpréter. Dans certains cas, les légionelles sont dénombrées en quantités importantes par la méthode de culture en gélose, alors que l'hybridation avec les sondes spécifique ou universelle n'a pas permis de détection. Ces limitations ont été retrouvées lors des tentatives de détection de *L. pneumophila* dans des biofilms constitués d'espèces décrites dans la littérature comme permettant une croissance satellitaire de *L. pneumophila* sur gélose BCYE sans cystéine. Dans ces expériences les légionelles n'ont pu être détectées que par culture et nous n'avons pas pu mettre en évidence de croissance en l'absence d'hôte protozoaire.

### 1-b. Essais de désinfection sur circuit pilote simulateur de réseau

Le protocole d'ensemencement utilisé a permis l'implantation rapide d'une flore microbienne complexe comprenant notamment une souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 et des amibes appartenant aux genres *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Vahlkampfia*. Après culture et ré-injection de la souche de *L. pneumophila* dans le pilote, les dénombrements selon la méthode AFNOR se sont stabilisés dans toutes

les canalisations à des niveaux pour lesquels des mesures correctives sont obligatoires :  $> 10^3$  UFC/L. L'utilisation de la méthode FISH a permis de confirmer la représentativité de la flore des biofilms avant traitement, dont la composition était semblable à celle décrite dans la littérature pour ce type d'écosystèmes. L'efficacité des traitements de désinfection a été évaluée sur l'eau et les biofilms des boucles de recirculation en acier galvanisé et des bras morts en cuivre, grâce aux méthodes classiques de culture sur gélose et à des marquages fluorescents permettant de distinguer la biomasse vivante de la biomasse morte.

Aux doses utilisées, le dioxyde de chlore a été le traitement le plus efficace pour contrôler la contamination à *L. pneumophila* et la flore hétérotrophe à la fois dans la boucle principale de recirculation et dans le bras mort. C'est le seul traitement ayant montré une activité résiduelle sur les biofilms du bras mort une fois le rinçage quotidien instauré. Dans les boucles de recirculation uniquement, le chlore a entraîné une disparition rapide et complète de la flore microbienne, y compris *L. pneumophila*. L'ozone, malgré son absence de rémanence, a permis de contrôler la contamination par *L. pneumophila* et a provoqué une diminution significative de la flore hétérotrophe des biofilms, sans toutefois l'éradiquer complètement. L'utilisation de la dose minimale recommandée pour la monochloramine a entraîné la disparition de *L. pneumophila* cultivée à partir de l'eau et des biofilms, mais n'a pas permis d'abaisser significativement la colonisation hétérotrophe. Enfin, le traitement par ionisation cuivre-argent a eu une efficacité médiocre, mise en évidence par la persistance de pics de contamination à *L. pneumophila* durant le traitement et une diminution seulement modérée des dénombrements de la flore hétérotrophe des biofilms.

Pendant toute l'étude, les amibes ont été détectées à partir de l'eau et des biofilms des boucles de recirculation et des bras morts, servant sans doute de "réservoir" aux légionelles qui retrouvaient leur niveau initial de colonisation quatre à cinq jours après l'arrêt des traitements.

#### 1-c. Auto-inducteurs et *L. pneumophila*

Les techniques de détection utilisées n'ont pas permis de mettre en évidence une sécrétion de molécules auto-inductrices de type 1 ou 2 par *L. pneumophila*. Par

ailleurs la pré-incubation des légionelles avec ces molécules ne semble pas modifier leur capacité à envahir et à se multiplier dans les amibes.

## 2 - Perspectives

### 2-a. Ecologie de *L. pneumophila* sur site

Les incubateurs ont démontré leur intérêt en tant qu'outil facilitant l'analyse des populations des biofilms des réseaux. Pour les besoins de l'étude nous avons implanté ces incubateurs dans un réseau non traité. Ils doivent maintenant être utilisés sur des réseaux traités, permettant ainsi une évaluation continue de l'efficacité des traitements de désinfection non seulement sur les bactéries planctoniques, comme c'était le cas jusque très récemment, mais aussi sur les biofilms et les populations de protistes. Des modifications doivent être envisagées afin de les rendre plus facilement utilisables : l'idéal serait d'avoir un incubateur construit dans le même matériau que celui dont sont constituées les canalisations, pouvant donc subir le même type de traitements de désinfection (thermique notamment). Les cartouches peuvent être remplies avec différents types de supports en fonction du but recherché : représentation de la colonisation du réseau ou amplification de la quantité de biomasse.

Dans le cadre du suivi de la colonisation de ces incubateurs par *L. pneumophila*, des essais complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer si la technique FISH est réellement applicable aux légionelles issues d'une multiplication intra-cellulaire et présentant un phénotype *a priori* peu favorable à l'hybridation. Par ailleurs, des modifications des protocoles de traitement des échantillons prélevés, telles que la revivification spécifique des légionelles en milieu BCYE avant fixation, sont envisageables. Les amibes doivent être utilisées afin d'augmenter l'activité métabolique des légionelles : culture systématique des amibes suivie de l'hybridation des bactéries intra-cellulaires, incubation des biofilms en présence de cultures d'amibes axéniques afin de permettre l'internalisation des légionelles à l'état libre. Ces modifications auraient l'intérêt de permettre de s'assurer de la viabilité des bactéries hybridées mais se feraient cependant au détriment de la rapidité de



l'analyse et de la quantification. Enfin, l'utilisation de sondes marquées avec plusieurs fluorochromes présentant éventuellement des fluorescences plus importantes (Panchuk-Voloshina *et al.* 1999; Pernthaler *et al.* 2002), ou de plusieurs sondes simultanément pourraient aussi permettre l'obtention d'un signal plus important.

#### 2-b. Essais de désinfection sur pilote

Les essais réalisés démontrent l'intérêt du circuit pilote développé par le CIRSEE pour comparer, dans des conditions identiques, différents traitements de désinfection. L'utilisation de plusieurs biocides conjointement : chlore et monochloramine notamment, semble améliorer l'efficacité sur les biofilms tout en permettant de diminuer les doses utilisées (Momba *et al.* 2003), il faut donc envisager de tester de telles associations sur le pilote. Par ailleurs, il semblerait que l'utilisation séquentielle de traitements différents : ozone puis chlore (Li *et al.* 2001), dioxyde de chlore puis chlore ou monochloramine (Corona-Vasquez *et al.* 2002) soit efficace pour inactiver les kystes de *Cryptosporidium*. Ils doivent donc être testés pour leur efficacité vis-à-vis des kystes d'*Acanthamoeba* infectés par les légionelles ou par d'autres pathogènes. Lors de ces essais, les amibes devront aussi être cultivées dans le but de réaliser la détection des pathogènes intra-cellulaires par FISH ou par d'autres méthodes : PCR, puces à ADN, ...

Les procédures d'acquisition et d'analyse des images obtenues après marquage fluorescent des biofilms doivent être améliorées afin de permettre le traitement d'un plus grand nombre d'échantillons : platines automatiques, matériel permettant la mise au point autofocus sur le microscope confocal pourraient s'avérer utiles, ainsi que le développement et/ou l'acquisition de logiciels informatiques capables de réaliser automatiquement la majeure partie du traitement des données.

#### 2-c. Légionelles et auto-inducteurs

Le séquençage complet du génome de *L. pneumophila* devrait aboutir dans les prochaines semaines et permettre de lever le doute quant à l'existence de gènes homologues à ceux codant pour la synthèse d'auto-inducteurs chez d'autres espèces. Cependant ces molécules peuvent présenter de nombreuses structures

différentes, il n'est donc pas exclu que chez certaines espèces bactériennes les gènes impliqués ne présentent pas d'homologies connues avec ces gènes (c'est le cas avec *hdtS* qui n'avait jamais été impliqué dans la synthèse des AI-1 avant la publication de Laue *et al.* 2000). Les tests de détection de ces molécules avec de nouvelles souches rapporteurs plus sensibles conservent donc leur intérêt et doivent être envisagés.

Dans le cadre de la problématique de l'invasion des protozoaires par des bactéries pathogènes pour l'Homme, il semble intéressant d'étudier l'impact des auto-inducteurs sur le comportement des protozoaires. En effet ces molécules provoquent aussi une modulation de l'expression des gènes chez certaines cellules eucaryotes (Mathesius *et al.* 2003). Or les protozoaires sont essentiellement présents dans les réseaux à la surface des biofilms, qu'ils "brouent" pour se nourrir (Sibille *et al.* 1998). Les bactéries présentes dans ces biofilms produisent des auto-inducteurs (McLean *et al.* 1997; Stickler *et al.* 1998) auxquels les protozoaires sont donc sûrement exposés, la possibilité d'une régulation de l'expression des gènes amibiens par le biofilm ne peut donc pas être exclue.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G. et Forsman, M.** (2003) Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 600-606.
- Absolom, D.R., Lamberti, F.V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C.J. et Neumann, A.W.** (1983) Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 90-97.
- Abu Kwaik, Y. et Pederson, L.L.** (1996) The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages. *Molecular Microbiology* 21, 543-556.
- Abu Kwaik, Y., Venkataraman, C., Harb, O.S. et Gao, L.Y.** (1998a) Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3134-3139.
- Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C. et Harb, O.S.** (1998b) Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3127-3133.
- Alary, M. et Joly, J.R.** (1992) Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by *Legionellae*. *Journal of Infectious Diseases* 165, 565-569.
- Allen, T.P., Fried, J.S., Wiegmann, T.B., Hodges, G.R., Dixon, A.Y., Lee, S.H. et MacDougall, M.L.** (1985) Legionnaires' disease associated with rash and renal failure. *Archives of Internal Medicine* 145, 729-730.
- Alli, O.A., Gao, L.Y., Pedersen, L.L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M. et Abu Kwaik, Y.** (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 68, 6431-6440.
- Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A. et Gilbert, P.** (1998) Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 167, 179-184.
- Amann, R., Springer, N., Ludwig, W., Gortz, H.D. et Schleifer, K.H.** (1991) Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* 351, 161-164.
- Amann, R., Springer, N., Schonhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E.N., Muller, K.D. et Michel, R.** (1997) Obligate intracellular bacterial parasites of *Acanthamoebae* related to *Chlamydia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 115-121.
- Amann, R.I., Krumholz, L. et Stahl, D.A.** (1990a) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172, 762-770.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. et Stahl, D.A.** (1990b) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1919-1925.
- Anand, C.M., Skinner, A.R., Malic, A. et Kurtz, J.B.** (1983) Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *Journal of Hygiene* 91, 167-178.
- Anonymous** (1997) Respiratory Infection — Pennsylvania. *MMWR - Morbidity & Mortality Weekly Report* 46, 49-56.
- Aragon, V., Kurtz, S., Flieger, A., Neumeister, B. et Cianciotto, N.P.** (2000) Secreted enzymatic activities of wild-type and *pilD*-deficient *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 68, 1855-1863.
- Arakaki, N., Higa, F., Koide, M., Tateyama, M. et Saito, A.** (2002) Induction of apoptosis of human macrophages in vitro by *Legionella longbeachae* through activation of the caspase pathway. *Journal of Medical Microbiology* 51, 159-168.
- Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Gorg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., Riedel, K. et Eberl, L.** (2003) Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic

- pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environmental Microbiology* 5, 1350-1369.
- Atlas, R.M.** (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology* 1, 283-293.
- Atlas, R.M., Williams, J.F. et Huntington, M.K.** (1995) *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1208-1213.
- Aurell, H., Etienne, J., Forey, F., Reyrolle, M., Girardo, P., Farge, P., Decludt, B., Campese, C., Vandenesch, F. et Jarraud, S.** (2003) *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3320-3322.
- Auty, M.A., Gardiner, G.E., McBrearty, S.J., O'Sullivan, E.O., Mulvihill, D.M., Collins, J.K., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. et Ross, R.P.** (2001) Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 420-425.
- Bakker, D.P., Van Der Plaats, A., Verkerke, G.J., Busscher, H.J. et Van Der Mei, H.C.** (2003) Comparison of velocity profiles for different flow chamber designs used in studies of microbial adhesion to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6280-6287.
- Barbaree, J.M., Fields, B.S., Feeley, J.C., Gorman, G.W. et Martin, W.T.** (1986) Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 422-424.
- Barbeau, J. et Buhler, T.** (2001) Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Research in Microbiology* 152, 753-760.
- Barker, J., Scaife, H. et Brown, M.R.** (1995) Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 2684-2688.
- Barker, J., Humphrey, T.J. et Brown, M.W.** (1999) Survival of *Escherichia coli* 0157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiology Letters* 173, 291-295.
- Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I. et Gilbert, P.** (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation [published erratum appears in Appl Environ Microbiol 1992 Dec;58(12):4089]. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2420-2425.
- Bartie, C., Venter, S.N. et Nel, L.H.** (2003) Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Research* 37, 1362-1370.
- Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. et Calderon, R.L.** (2000) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveillance Summaries* 49, 1-21.
- Bassler, B.L., Wright, M. et Silverman, M.R.** (1994a) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology* 13, 273-286.
- Bassler, B.L., Wright, M. et Silverman, M.R.** (1994b) Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology* 12, 403-412.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P. et Stevens, A.M.** (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* 179, 4043-4045.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E. et Silverman, M.R.** (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology* 9, 773-786.
- Baveye, P.** (2002) Comment on "Evaluation of biofilm image thresholding methods". *Water Research* 36, 805-806.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H. et Atlas, R.M.** (1991) Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 597-600.
- Bellinger-Kawahara, C. et Horwitz, M.A.** (1990) Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and

- mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 172, 1201-1210.
- Bellon-Fontaine, M.N., Mozes, N., van der Mei, H.C., Sjollem, J., Cerf, O., Rouxhet, P.G. et Busscher, H.J.** (1990) A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics* 17, 93-106.
- Belyi, I., Popoff, M.R. et Cianciotto, N.P.** (2003) Purification and characterization of a UDP-glucosyltransferase produced by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 71, 181-186.
- Bemer, P., Leautez, S., Ninin, E., Jarraud, S., Raffi, F. et Drugeon, H.** (2002) *Legionella pneumophila* arthritis: use of medium specific for Mycobacteria for isolation of *L. pneumophila* in culture of articular fluid specimens. *Clinical Infectious Diseases* 35, E6-7.
- Bentham, R.H.** (2000) Routine sampling and the control of *Legionella* spp. in cooling tower water systems. *Current Microbiology* 41, 271-275.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. et Hopwood, D.A.** (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.
- Berendt, R.F.** (1981) Influence of blue-green algae (cyanobacteria) on survival of *Legionella pneumophila* in aerosols. *Infection and Immunity* 32, 690-692.
- Berger, K.H. et Isberg, R.R.** (1993) Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 7, 7-19.
- Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W. et Ashburn, R.J.** (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 279-286.
- Bernander, S., Jacobson, K., Helbig, J.H., Luck, P.C. et Lundholm, M.** (2003) A hospital-associated outbreak of Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2503-2508.
- Birtles, R.J., Rowbotham, T.J., Storey, C., Marrie, T.J. et Raoult, D.** (1997) *Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet* 349, 925-926.
- Bohach, G.A. et Snyder, I.S.** (1983) Characterization of surfaces involved in adherence of *Legionella pneumophila* to *Fischerella* species. *Infection and Immunity* 42, 318-325.
- Bosshardt, S.C., Benson, R.F. et Fields, B.S.** (1997) Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*. *Microbial Pathogenesis* 23, 107-112.
- Bottone, E.J., Madayag, R.M. et Qureshi, M.N.** (1992) *Acanthamoeba* keratitis: synergy between amebic and bacterial cocontaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2447-2450.
- Botzenhart, K., Bartram, J., Butler, J., Havelaar, A.H., Lee, J., Mariee, T., Pastoris, C., Plouffe, J., Tiefenbrunner, F. et Yu, V.** (2002). *Legionella*. World Health Organization. Geneva, Switzerland
- Boulanger, C.A. et Edelstein, P.H.** (1995) Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1805-1809.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. et Desjardins, R.** (1999) LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37, 77-86.
- Bozue, J.A. et Johnson, W.** (1996) Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infection and Immunity* 64, 668-673.

- Brassinga, A.K., Hiltz, M.F., Sisson, G.R., Morash, M.G., Hill, N., Garduno, E., Edelstein, P.H., Garduno, R.A. et Hoffman, P.S.** (2003) A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* 185, 4630-4637.
- Brenner, D.J.** (1987) Classification of the *Legionellae*. *Seminars in Respiratory Infections* 2, 190-205.
- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Epple, P., Bibb, W.F., McKinney, R.M., Starnes, R.W., Colville, J.M., Selander, R.K., Edelstein, P.H. et Moss, C.W.** (1988) *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 1695-1703.
- Brieland, J., McClain, M., LeGendre, M. et Engleberg, C.** (1997a) Intrapulmonary *Hartmannella vermiformis*: a potential niche for *Legionella pneumophila* replication in a murine model of legionellosis. *Infection and Immunity* 65, 4892-4896.
- Brieland, J.K., Fantone, J.C., Remick, D.G., LeGendre, M., McClain, M. et Engleberg, N.C.** (1997b) The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infection and Immunity* 65, 5330-5333.
- Brown, C.M., Nuorti, P.J., Breiman, R.F., Hathcock, A.L., Fields, B.S., Lipman, H.B., Llewellyn, G.C., Hofmann, J. et Cetron, M.** (1999) A community outbreak of Legionnaires' disease linked to hospital cooling towers: an epidemiological method to calculate dose of exposure. *International Journal of Epidemiology* 28, 353-359.
- Bumbaugh, A.C., McGraw, E.A., Page, K.L., Selander, R.K. et Whittam, T.S.** (2002) Sequence polymorphism of *dotA* and *mip* alleles mediating invasion and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Current Microbiology* 44, 314-322.
- Buswell, C.M., Herlihy, Y.M., Marsh, P.D., Keevil, C.W. et Leach, S.A.** (1997) Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 83, 477-484.
- Cabanes, P.A., Wallet, F., Pringuez, E. et Pernin, P.** (2001) Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2927-2931.
- Call, D.R., Borucki, M.K. et Loge, F.J.** (2003) Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *Journal of Microbiological Methods* 53, 235-243.
- Camara Gonzalez, T., Lazaro Moreno, T., de Andrés de Colsa, T. et Orejas Gonzalez, B.** (1993) [Pericarditis due to *Legionella*]. *Anales de Medicina Interna* 10, 449-451.
- Campese, C., Che, D., Maine, C. et Decludt, B.** (2003) [Les légionelloses déclarées en France en 2002]. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 32, 153-155.
- Campos, C., Loret, J.F., Cooper, A.J. et Kelly, R.F.** (2003) Disinfection of domestic water systems for *Legionella pneumophila*. *Journal of Water Supply: Research and Technology—Aqua* 52, 341-354.
- Cargill, K.L., Pyle, B.H., Sauer, R.L. et McFeters, G.A.** (1992) Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila* [published erratum appears in *Can J Microbiol* 1992 Oct;38(10):1089]. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 423-429.
- Carpentier, B. et Cerf, O.** (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 499-511.
- Carrington, G.O.** (1979) Legionnaires' disease bacillus: inhibition by normal flora. *Clinical Microbiology Newsletter* 1, 7-8.
- Castellani Pastoris, M., Ciceroni, L., Lo Monaco, R., Goldoni, P., Mentore, B., Flego, G., Cattani, L., Ciarrocchi, S., Pinto, A. et Visca, P.** (1997) Molecular epidemiology of an outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Genova-Sestri Ponente, Italy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16, 883-892.

- Catalan, V., Moreno, C., Dasi, M.A., Munoz, C. et Apraiz, D.** (1994) Nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in water. *Research in Microbiology* 145, 603-610.
- Chandy, J.P. et Angles, M.L.** (2001) Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. *Water Research* 35, 2677-2682.
- Chang, Y.C., Le Puil, M., Biggerstaff, J., Randall, A.A., Schulte, A. et Taylor, J.S.** (2003) Direct estimation of biofilm density on different pipe material coupons using a specific DNA-probe. *Molecular and Cellular Probes* 17, 237-243.
- Chen, X. et Stewart, P.S.** (2002a) Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 718-720.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsseleer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L. et Hughson, F.M.** (2002b) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545-549.
- Chiang, P. et Burrows, L.L.** (2003) Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 185, 2374-2378.
- Cho, M., Chung, H. et Yoon, J.** (2003) Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2284-2291.
- Choi, J.Y., Lee, T.W., Jeon, K.W. et Ahn, T.I.** (1997) Evidence for symbiont-induced alteration of a host's gene expression: irreversible loss of SAM synthetase from *Amoeba proteus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 44, 412-419.
- Christensen, B.B., Haagensen, J.A., Heydorn, A. et Molin, S.** (2002) Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2495-2502.
- Christie, P.J.** (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology* 40, 294-305.
- Christie, P.J. et Vogel, J.P.** (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in Microbiology* 8, 354-360.
- Cirillo, J.D., Falkow, S. et Tompkins, L.S.** (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and Immunity* 62, 3254-3261.
- Cirillo, S.L., Bermudez, L.E., El-Etr, S.H., Duhamel, G.E. et Cirillo, J.D.** (2001) *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. *Infection and Immunity* 69, 508-517.
- Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. et Hillyard, D.R.** (2000) Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1709-1712.
- Cochran, W.L., McFeters, G.A. et Stewart, P.S.** (2000) Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of Applied Microbiology* 88, 22-30.
- Coers, J., Kagan, J.C., Matthews, M., Nagai, H., Zuckman, D.M. et Roy, C.R.** (2000) Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Molecular Microbiology* 38, 719-736.
- Conway, B.A., Venu, V. et Speert, D.P.** (2002) Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Bacteriology* 184, 5678-5685.
- Corona-Vasquez, B., Rennecker, J.L., Driedger, A.M. et Marinas, B.J.** (2002) Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide followed by free chlorine or monochloramine. *Water Research* 36, 178-188.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., Van Delden, C., Curty, L.K. et Kohler, T.** (2002) *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *Journal of Bacteriology* 184, 3027-3033.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. et Lappin-Scott, H.M.** (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711-745.

- Coubrough, P., Modisenyane, T. et Genthe, B.** (2002) Proposed method for optimum recovery of *Legionella* from cooling water in South Africa. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. pp. 280-283. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Cowan, S.E., Gilbert, E., Liepmann, D. et Keasling, J.D.** (2000) Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4481-4485.
- Coxon, P.Y., Summersgill, J.T., Ramirez, J.A. et Miller, R.D.** (1998) Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes. *Infection and Immunity* 66, 2905-2913.
- CSHP** (2001). Gestion du risque lié aux légionelloses. Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Paris, France
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. et Wagner, M.** (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 434-444.
- Danese, P.N., Pratt, L.A. et Kolter, R.** (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* 182, 3593-3596.
- Davey, M.E. et O'Toole G, A.** (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 847-867.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C. et O'Toole, G.A.** (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 185, 1027-1036.
- Davies, D.G.** (2000) Physiological events in biofilm formation. In *Community Structure and Co-operation in Biofilms* ed. Allison, D.G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M., et Wilson, M. pp. 37-52. Cambridge: Cambridge University Press.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. et Greenberg, E.P.** (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298.
- Day, W.A., Jr. et Maurelli, A.T.** (2001) *Shigella flexneri* LuxS quorum-sensing system modulates *virB* expression but is not essential for virulence. *Infection and Immunity* 69, 15-23.
- De Gheldre, Y., Maes, N., Presti, F.L., Etienne, J. et Struelens, M.** (2001) Rapid identification of clinically relevant *Legionella* spp. by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 162-169.
- de Kievit, T.R. et Iglewski, B.H.** (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity* 68, 4839-4849.
- De Luca, G., Stampi, S., Lezzi, L. et Zanetti, F.** (1999) Effect of heat and acid decontamination treatments on the recovery of *Legionella pneumophila* from drinking water using two selective media. *New Microbiologica* 22, 203-208.
- Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A. et Ollevier, F.** (2003) PCR as a test for the presence or absence of *Legionella* in (cooling) water. *Water Science and Technology* 47, 103-107.
- DeKeersmaecker, S.C. et Vanderleyden, J.** (2003) Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology* 149, 1953-1956.
- DeLisa, M.P., Wu, C.F., Wang, L., Valdes, J.J. et Bentley, W.E.** (2001) DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 183, 5239-5247.
- Deng, J.C., Tateda, K., Zeng, X. et Standiford, T.J.** (2001) Transient transgenic expression of gamma interferon promotes *Legionella pneumophila* clearance in immunocompetent hosts. *Infection and Immunity* 69, 6382-6390.



- Dennis, P.J. et Lee, J.V.** (1988) Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 135-141.
- Desai, R., Welsh, C., Summy, M., Farone, M. et Newsome, A.L.** (1999) The potential of *in situ* hybridization and an immunogold assay to identify *Legionella* associations with other microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 37, 155-164.
- Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B. et Darfeuille-Michaud, A.** (2003) *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology* 154, 9-16.
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J. et Steinert, M.** (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infection and Immunity* 69, 2116-2122.
- Diogo, A., Verissimo, A., Nobre, M.F. et da Costa, M.S.** (1999) Usefulness of fatty acid composition for differentiation of *Legionella* species. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2248-2254.
- Doléans, A., Jarraud, S., Reyrolle, M., Lina, G., Etienne, J. et Freney, J.** (2003) [Caractérisation des souches cliniques et environnementales de *Legionella* en France, 2001-2002]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 34, 161-162.
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L. et Zhang, L.H.** (2002) Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1754-1759.
- Donlan, R., Murga, R., Brown, E., Carpenter, J., Besser, R. et Fields, B.** (2002) Monochloramine disinfection of biofilm-associated *Legionella pneumophila* in a potable water model system. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lüch, P.C. pp. 406-410. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Doyle, R.M., Cianciotto, N.P., Banvi, S., Manning, P.A. et Heuzenroeder, M.W.** (2001) Comparison of virulence of *Legionella longbeachae* strains in guinea pigs and U937 macrophage-like cells. *Infection and Immunity* 69, 5335-5344.
- Doyle, R.M., Steele, T.W., McLennan, A.M., Parkinson, I.H., Manning, P.A. et Heuzenroeder, M.W.** (1998) Sequence analysis of the *mip* gene of the soilborne pathogen *Legionella longbeachae*. *Infection and Immunity* 66, 1492-1499.
- Drenning, S.D., Stout, J.E., Joly, J.R. et Yu, V.L.** (2001) Unexpected similarity of pulsed-field gel electrophoresis patterns of unrelated clinical isolates of *Legionella pneumophila*, serogroup 1. *Journal of Infectious Diseases* 183, 628-632.
- Dumenil, G. et Isberg, R.R.** (2001) The *Legionella pneumophila* *lcmR* protein exhibits chaperone activity for *lcmQ* by preventing its participation in high-molecular-weight complexes. *Molecular Microbiology* 40, 1113-1127.
- Edelstein, P.H., Hu, B., Higa, F. et Edelstein, M.A.** (2003) *lvgA*, a novel *Legionella pneumophila* virulence factor. *Infection and Immunity* 71, 2394-2403.
- Eisenmann, H., Harms, H., Meckenstock, R., Meyer, E.I. et Zehnder, A.J.** (1998) Grazing of *Tetrahymena* sp. on adhered bacteria in percolated columns monitored by *in situ* hybridization with fluorescent oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1264-1269.
- EPA** (1999). Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual. EPA 815-R-99-014 Environmental Protection Agency, USA.
- Espinosa-Urgel, M.** (2003) Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *Journal of Bacteriology* 185, 699-700.
- Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U. et Marre, R.** (1997) Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1396-1399.
- Ettinger, M.R., Webb, S.R., Harris, S.A., McIninch, S.P., G, C.G. et Brown, B.L.** (2003) Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitology Research* 89, 6-15.

- Evans, G.E., Murdoch, D.R., Anderson, T.P., Potter, H.C., George, P.M. et Chambers, S.T.** (2003) Contamination of Qiagen DNA extraction kits with *Legionella* DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3452-3453.
- Fabbi, M., Pastoris, M.C., Scanziani, E., Magnino, S. et Di Matteo, L.** (1998) Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1942-1947.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C. et Benezech, T.** (2002) Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 728-738.
- Falkinham, J.O., 3rd, Norton, C.D. et LeChevallier, M.W.** (2001) Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1225-1231.
- Faulkner, G. et Garduno, R.A.** (2002) Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* 184, 7025-7041.
- Fernandez, R.C., Logan, S.M., Lee, S.H. et Hoffman, P.S.** (1996) Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. *Infection and Immunity* 64, 1968-1976.
- Fettes, P.S., Forsbach-Birk, V., Lynch, D. et Marre, R.** (2001) Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation. *International Journal of Medical Microbiology* 291, 353-360.
- Fields, B.** (1993) *Legionella* and protozoa: interaction of a pathogen and its natural host. In *Legionella, Current Status and Emerging Perspectives* ed. Barbaree, J.M., Breiman, R.F., et Dufour, A.P. pp. 129-136. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Fields, B.S.** (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends in Microbiology* 4, 286-290.
- Fields, B.S.** (1997) *Legionellae* and Legionnaires' disease. In *Manual of Environmental Microbiology* ed. Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., et Walter, M.V. pp. 666-675. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Fields, B.S.** (2002) The social life of Legionellae. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. pp. 135-142. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Fields, B.S., Benson, R.F. et Besser, R.E.** (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 506-526.
- Fields, B.S., Shotts, E.B., Jr., Feeley, J.C., Gorman, G.W. et Martin, W.T.** (1984) Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 467-471.
- Fields, B.S., Nerad, T.A., Sawyer, T.K., King, C.H., Barbaree, J.M., Martin, W.T., Morrill, W.E. et Sanden, G.N.** (1990) Characterization of an axenic strain of *Hartmannella vermiformis* obtained from an investigation of nosocomial legionellosis. *J Protozool* 37, 581-583.
- Flemming, H.C.** (2002) Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 629-640.
- Flemming, H.C. et Wingender, J.** (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* 43, 1-8.
- Flesher, A.R., Kasper, D.L., Modern, P.A. et Mason, E.O., Jr.** (1980) *Legionella pneumophila*: growth inhibition by human pharyngeal flora. *Journal of Infectious Diseases* 142, 313-317.
- Fliieger, A., Neumeister, B. et Cianciotto, N.P.** (2002) Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infection and Immunity* 70, 6094-6106.
- Fliermans, C.B.** (1996) Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with a little wisdom. *Microbial Ecology* 32, 203-228.

- Fong, K.P., Chung, W.O., Lamont, R.J. et Demuth, D.R.** (2001) Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infection and Immunity* 69, 7625-7634.
- Franzin, L., Scolfaro, C., Cabodi, D., Valera, M. et Tovo, P.A.** (2001) *Legionella pneumophila* pneumonia in a newborn after water birth: a new mode of transmission. *Clinical Infectious Diseases* 33, e103-104.
- Fratamico, P.M. et Cooke, P.H.** (1996) Isolation of bdellovibrios that prey on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces. *Journal of Food Safety* 16, 161-173.
- Freeman, J.A. et Bassler, B.L.** (1999) Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* 181, 899-906.
- Friedman, M.G., Dvoskin, B. et Kahane, S.** (2003) Infections with the chlamydia-like microorganism *Simkania negevensis*, a possible emerging pathogen. *Microbes and Infection* 5, 1013-1021.
- Fritsche, T.R., Sobek, D. et Gautom, R.K.** (1998) Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS Microbiology Letters* 166, 231-236.
- Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Seyedirashti, S., Bergeron, D.L. et Lindquist, T.D.** (1993) Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 1122-1126.
- Fritsche, T.R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R.K., Schleifer, K.H. et Wagner, M.** (1999) In situ detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 206-212.
- Fritsche, T.R., Horn, M., Wagner, M., Herwig, R.P., Schleifer, K.H. et Gautom, R.K.** (2000) Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2613-2619.
- Fry, N.K. et Harrison, T.G.** (1998) An evaluation of intergenic rRNA gene sequence length polymorphism analysis for the identification of *Legionella* species. *Journal of Medical Microbiology* 47, 667-678.
- Fry, N.K., Bangsberg, J.M., Bernander, S., Etienne, J., Forsblom, B., Gaia, V., Hasenberger, P., Lindsay, D., Papoutsi, A., Pelaz, C., Struelens, M., Uldum, S.A., Visca, P. et Harrison, T.G.** (2000) Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19, 773-780.
- Fuqua, C. et Greenberg, E.P.** (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3, 685-695.
- Gal-Mor, O. et Segal, G.** (2003) The *Legionella pneumophila* GacA homolog (LetA) is involved in the regulation of *icm* virulence genes and is required for intracellular multiplication in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbial Pathogenesis* 34, 187-194.
- Gal-Mor, O., Zusman, T. et Segal, G.** (2002) Analysis of DNA regulatory elements required for expression of the *Legionella pneumophila icm* and *dot* virulence genes. *Journal of Bacteriology* 184, 3823-3833.
- Gao, L.Y. et Abu Kwaik, Y.** (1999a) Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infection and Immunity* 67, 862-870.
- Gao, L.Y. et Abu Kwaik, Y.** (1999b) Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infection and Immunity* 67, 4886-4894.
- Gao, L.Y., Harb, O.S. et Abu Kwaik, Y.** (1997) Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infection and Immunity* 65, 4738-4746.

- Gao, L.Y., Harb, O.S. et Kwaik, Y.A.** (1998) Identification of macrophage-specific infectivity loci (*mil*) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. *Infection and Immunity* 66, 883-892.
- Garcia-Junco, M., De Olmedo, E. et Ortega-Calvo, J.J.** (2001) Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environmental Microbiology* 3, 561-569.
- Garduno, R.A., Garduno, E. et Hoffman, P.S.** (1998a) Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infection and Immunity* 66, 4602-4610.
- Garduno, R.A., Quinn, F.D. et Hoffman, P.S.** (1998b) HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 430-440.
- Garduno, R.A., Garduno, E., Hiltz, M. et Hoffman, P.S.** (2002) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and Immunity* 70, 6273-6283.
- Garduno, R.A., Faulkner, G., Trevors, M.A., Vats, N. et Hoffman, P.S.** (1998c) Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* 180, 505-513.
- Gavi, n, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J.G. et Tomas, J.M.** (2003) Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiology Letters* 224, 77-83.
- Gaze, W.H., Burroughs, N., Gallagher, M.P. et Wellington, E.M.** (2003) Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microbial Ecology*.
- George, J.R., Pine, L., Reeves, M.W. et Harrell, W.K.** (1980) Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 11, 286-291.
- Gerhardt, H., Walz, M.J., Faigle, M., Northoff, H., Wolburg, H. et Neumeister, B.** (2000) Localization of *Legionella* bacteria within ribosome-studded phagosomes is not restricted to *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters* 192, 145-152.
- Gibson, F.C., Tzianabos, A.O. et Rodgers, F.G.** (1994) Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement- independent binding mechanism. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 865-872.
- Golovliov, I., Baranov, V., Krocova, Z., Kovarova, H. et Sjostedt, A.** (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infection and Immunity* 71, 5940-5950.
- Gomez-Lus, R., Lomba, E., Gomez-Lus, P., Abarca, M.S., Gomez-Lus, S., Martinez, A., Duran, E. et Rubio, M.C.** (1993) In vitro antagonistic activity of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Aeromonas* spp. against *Legionella* spp. In *Legionella, Current Status and Emerging Perspectives* ed. Barbaree, J.M., Breiman, R.F., et Dufour, A.P. pp. 265-267. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Gorman, G.W., Feeley, J.C., Steigerwalt, A., Edelstein, P.H., Moss, C.W. et Brenner, D.J.** (1985) *Legionella anisa*: a new species of *Legionella* isolated from potable waters and a cooling tower. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 305-309.
- Grange, J.M., Dewar, C.A. et Rowbotham, T.J.** (1987) Microbe dependence of *Mycobacterium leprae*: a possible intracellular relationship with protozoa. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 55, 565-566.
- Greub, G. et Raoult, D.** (2002) Crescent bodies of *Parachlamydia acanthamoeba* and its life cycle within *Acanthamoeba polyphaga*: an electron micrograph study. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3076-3084.
- Greub, G. et Raoult, D.** (2003a) Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmannella vermiformis*. *Research in Microbiology* 154, 619-621.
- Greub, G., La Scola, B. et Raoult, D.** (2003b) *Parachlamydia acanthamoeba* is endosymbiotic or lytic for *Acanthamoeba polyphaga* depending on the incubation temperature. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990, 628-634.

- Greub, G., Boyadjiev, I., La Scola, B., Raoult, D. et Martin, C.** (2003c) Serological hint suggesting that *Parachlamydiaceae* are agents of pneumonia in polytraumatized intensive care patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990, 311-319.
- Grimm, D.** (2000). Entwicklung von neuen Nachweismethoden für Legionellen und Amöben und ihre Anwendung in ökologischen Studien. PhD Thesis. Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Germany
- Grimm, D., Merkert, H., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Hacker, J. et Brand, B.C.** (1998) Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2686-2690.
- Grimm, D., Ludwig, W.F., Brandt, B.C., Michel, R., Schleifer, K.H., Hacker, J. et Steinert, M.** (2001) Development of 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes for specific detection of *Hartmannella* and *Naegleria* in *Legionella*-positive environmental samples. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 76-82.
- Grow, A.E., Wood, L.L., Claycomb, J.L. et Thompson, P.A.** (2003) New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *Journal of Microbiological Methods* 53, 221-233.
- Haagensen, J.A.J., Hansen, S.K., Johansen, T. et Molin, S.** (2002) In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 261-268.
- Hagele, S., Kohler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J. et Steinert, M.** (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cellular Microbiology* 2, 165-171.
- Hahn, M.W. et Hofle, M.G.** (1998) Grazing pressure by a bacterivorous flagellate reverses the relative abundance of *Comamonas acidovorans* PX54 and *Vibrio* strain CB5 in chemostat cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1910-1918.
- Hahn, M.W. et Hofle, M.G.** (1999a) Flagellate predation on a bacterial model community: interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4863-4872.
- Hahn, M.W. et Hofle, M.G.** (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 113-121.
- Hahn, M.W., Moore, E.R. et Hofle, M.G.** (1999b) Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 25-35.
- Hales, L.M. et Shuman, H.A.** (1999a) The *Legionella pneumophila rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Bacteriology* 181, 4879-4889.
- Hales, L.M. et Shuman, H.A.** (1999b) *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infection and Immunity* 67, 3662-3666.
- Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F. et Simms, J.** (2001) The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Research* 35, 4063-4071.
- Hammer, B.K. et Swanson, M.S.** (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Molecular Microbiology* 33, 721-731.
- Hammer, B.K. et Bassler, B.L.** (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* 50, 101-104.
- Hammer, B.K., Tateda, E.S. et Swanson, M.S.** (2002) A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 44, 107-118.
- Harb, O.S. et Abu Kwaik, Y.** (2000) Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (*milA*) of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 68, 368-376.
- Harb, O.S., Venkataraman, C., Haack, B.J., Gao, L.Y. et Kwaik, Y.A.** (1998) Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 126-132.
- Harf, C. et Monteil, H.** (1988) Interactions between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. *Water Science and Technology* 20, 235-239.

- Hassett, D.J., Ma, J.F., Elkins, J.G., McDermott, T.R., Ochsner, U.A., West, S.E., Huang, C.T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P.S., McFeters, G., Passador, L. et Iglewski, B.H. (1999) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology* 34, 1082-1093.
- Haussler, S., Rohde, M., von Neuhoff, N., Nimtz, M. et Steinmetz, I. (2003) Structural and functional cellular changes induced by *Burkholderia pseudomallei* rhamnolipid. *Infection and Immunity* 71, 2970-2975.
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C. et White, O. (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477-483.
- Heidelberg, J.F., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Gaidos, E.J., Nelson, W.C., Read, T.D., Eisen, J.A., Seshadri, R., Ward, N., Methe, B., Clayton, R.A., Meyer, T., Tsapin, A., Scott, J., Beanan, M., Brinkac, L., Daugherty, S., DeBoy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Haft, D.H., Kolonay, J.F., Madupu, R., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Wolf, A.M., Vamathevan, J., Weidman, J., Impraim, M., Lee, K., Berry, K., Lee, C., Mueller, J., Khouri, H., Gill, J., Utterback, T.R., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Smith, H.O., Venter, J.C., Neelson, K.H. et Fraser, C.M. (2002) Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnology* 20, 1118-1123.
- Helbig, J.H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., Lindsay, D., Luck, P.C., Marques, T., Mentula, S., Peeters, M.F., Pelaz, C., Struelens, M., Uldum, S.A., Wewalka, G. et Harrison, T.G. (2002) Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21, 710-716.
- Hendrickx, L., Hausner, M. et Wuertz, S. (2003) Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1721-1727.
- Heng, B.H., Goh, K.T., Ng, D.L. et Ling, A.E. (1997) Surveillance of legionellosis and *Legionella* bacteria in the built environment in Singapore. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 26, 557-565.
- Herpers, B.L., De Jongh, B.M., Van Der Zwaluw, K. et Van Hannen, E.J. (2003) Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4815-4816.
- Heuner, K., Brand, B.C. et Hacker, J. (1999) The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiology Letters* 175, 69-77.
- Heuner, K., Dietrich, C., Skriwan, C., Steinert, M. et Hacker, J. (2002) Influence of the alternative sigma(28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 70, 1604-1608.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K. et Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146, 2395-2407.
- Hickey, E.K. et Cianciotto, N.P. (1997) An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infection and Immunity* 65, 133-143.
- Higa, F. et Edelstein, P.H. (2001) Potential virulence role of the *Legionella pneumophila* *ptsP* ortholog. *Infection and Immunity* 69, 4782-4789.
- Hilbi, H., Segal, G. et Shuman, H.A. (2001) Icm/Dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 42, 603-617.

- Hoffmann, R. et Michel, R.** (2001) Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203, 215-219.
- Hoffmann, R., Michel, R., Schmid, E.N. et Muller, K.D.** (1998) Natural infection with microsporidian organisms (KW19) in *Vannella* spp. (Gymnamoebia) isolated from a domestic tap-water supply. *Parasitology Research* 84, 164-166.
- Holden, E.P., Winkler, H.H., Wood, D.O. et Leinbach, E.D.** (1984) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Infection and Immunity* 45, 18-24.
- Hookey, J.V., Birtles, R.J. et Saunders, N.A.** (1995) Intergenic 16S rRNA gene (rDNA)-23S rDNA sequence length polymorphisms in members of the family *Legionellaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2377-2381.
- Hope, C.K., Clements, D. et Wilson, M.** (2002) Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *Journal of Applied Microbiology* 93, 448-455.
- Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K.H. et Wagner, M.** (1999) Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environmental Microbiology* 1, 357-367.
- Horn, M., Fritsche, T.R., Linner, T., Gautom, R.K., Harzenetter, M.D. et Wagner, M.** (2002) Obligate bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the beta-*Proteobacteria*: proposal of '*Candidatus Procabacter acanthamoebae*' gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 599-605.
- Horn, M., Wagner, M., Muller, K.D., Schmid, E.N., Fritsche, T.R., Schleifer, K.H. et Michel, R.** (2000) *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (*Parachlamydiaceae*), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* 146, 1231-1239.
- Horn, M., Harzenetter, M.D., Linner, T., Schmid, E.N., Muller, K.D., Michel, R. et Wagner, M.** (2001) Members of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* phylum as intracellular bacteria of acanthamoebae: proposal of '*Candidatus Amoebophilus asiaticus*'. *Environmental Microbiology* 3, 440-449.
- Huang, C.T., Yu, F.P., McFeters, G.A. et Stewart, P.S.** (1995) Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2252-2256.
- Inglis, T.J., Robertson, T., Woods, D.E., Dutton, N. et Chang, B.J.** (2003) Flagellum-mediated adhesion by *Burkholderia pseudomallei* precedes invasion of *Acanthamoeba astronyxis*. *Infection and Immunity* 71, 2280-2282.
- Inglis, T.J., Rigby, P., Robertson, T.A., Dutton, N.S., Henderson, M. et Chang, B.J.** (2000) Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape. *Infection and Immunity* 68, 1681-1686.
- Inoue, H., Kawano, G., Nagasawa, H. et Sakuda, S.** (2002) Isolation of elemental sulfur as a self-growth-inhibiting substance produced by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4809-4811.
- Isaac-Renton, J., Bowie, W.R., King, A., Irwin, G.S., Ong, C.S., Fung, C.P., Shokeir, M.O. et Dubey, J.P.** (1998) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2278-2280.
- Ishimatsu, S., Miyamoto, H., Hori, H., Tanaka, I. et Yoshida, S.** (2001) Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower. *The Annals of Occupational Hygiene* 45, 421-427.
- Jacangelo, J.G., Olivieri, V.P. et Kawata, K.** (1987) Oxidation of sulhydryl groups by monochloramine. *Water Research* 21, 1339-1344.
- Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E. et Romeo, T.** (2002) Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 184, 290-301.

- Jackson, L. et Whiting, R.C.** (1992) Reduction of an *Escherichia coli* K12 population by *Bdellovibrio bacteriovorus* under various in vitro conditions of parasite: host ratio, temperature, or pH. *Journal of Food Protection* 55, 859-861.
- Jadin, J.B.** (1975) Amibes Limax vecteurs possibles de Mycobacteries et de *M. leprae*. *Acta Leprologica* 59, 57-67.
- James, A.M.** (1979) Molecular aspects of biological surfaces. *Chem Soc Rev* 8, 389-418.
- James, A.M.** (1982) The electrical properties and topochemistry of bacterial cells. *Advances in colloid and surfaces science* 15, 171-221.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Dennis, P.J. et Keevil, C.W.** (1997) A study of iron acquisition mechanisms of *Legionella pneumophila* grown in chemostat culture. *Current Microbiology* 34, 238-243.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Fitzgeorge, R.B., Dennis, P.J. et Keevil, C.W.** (1995) Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 63, 4224-4230.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Dennis, P.J., Keevil, C.W. et Wait, R.** (1999) Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 822-827.
- Jana, T.K., Srivastava, A.K., Csery, K. et Arora, D.K.** (2000) Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 28-37.
- Jaulhac, B., Harf, C., Nowicki, M. et Monteil, H.** (1993) Detection of *Legionella* spp. in environmental water samples and free-living amoebae by using DNA amplification. In *Legionella, Current Status and Emerging Perspectives* ed. Barbaree, J.M., Breiman, R.F., et Dufour, A.P. pp. 151-153. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Jeon, K.W.** (1995) The large, free-living amoebae: wonderful cells for biological studies. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 42, 1-7.
- Johnson, C.H., Rice, E.W. et Reasoner, D.J.** (1997) Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4969-4970.
- Johnson, W., Varner, L. et Poch, M.** (1991) Acquisition of iron by *Legionella pneumophila*: role of iron reductase. *Infection and Immunity* 59, 2376-2381.
- Jonas, D., Meyer, H.G., Matthes, P., Hartung, D., Jahn, B., Daschner, F.D. et Jansen, B.** (2000) Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of legionnaires' disease in hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2284-2291.
- Joseph, C.** (2002) Surveillance of legionnaires's disease in Europe. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. pp. 311-317. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Joshi, A.D. et Swanson, M.S.** (1999) Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. *Infection and Immunity* 67, 4134-4142.
- Kac, G. et Fagon, J.Y.** (2002) La légionellose : encore des questions non résolues. *La Revue de Medecine Interne* 23, 415-418.
- Kagan, J.C. et Roy, C.R.** (2002) *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nature Cell Biology* 4, 945-954.
- Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M. et Friedman, M.G.** (2001) Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4789-4795.
- Kahn, R.A., Fu, H. et Roy, C.R.** (2002) Cellular hijacking: a common strategy for microbial infection. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 308-314.
- Kalmbach, S., Manz, W. et Szewzyk, U.** (1997a) Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4164-4170.
- Kalmbach, S., Manz, W. et Szewzyk, U.** (1997b) Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 265-279.



- Kalmbach, S., Manz, W., Bendinger, B. et Szewzyk, U.** (2000) In situ probing reveals *Aquabacterium commune* as a widespread and highly abundant bacterial species in drinking water biofilms. *Water Research* 34, 575-581.
- Karim, A., Ahmed, S. et Rossoff, L.J.** (2002) Legionnaire's disease associated with acute encephalitis and arrhythmia. *Critical Care Medicine* 30, 1028-1029.
- Kilvington, S. et Price, J.** (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 519-525.
- Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A. et Kendall, A.M.** (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research* 36, 4433-4444.
- Kim, M.J., Sohn, J.W., Park, D.W., Park, S.C. et Chun, B.C.** (2003) Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2974-2979.
- King, C.H., Shotts, E.B., Jr., Wooley, R.E. et Porter, K.G.** (1988) Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3023-3033.
- Kinnear, F.B.** (2003) Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella*: quantitative & qualitative in vitro studies on keratocytes. *Journal of Infection* 46, 228-237.
- Kjaergaard, K., Schembri, M.A., Ramos, C., Molin, S. et Klemm, P.** (2000) Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environmental Microbiology* 2, 695-702.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. et Tolker-Nielsen, T.** (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology* 50, 61-68.
- Ko, K.S., Hong, S.K., Lee, K.H., Lee, H.K., Park, M.Y., Miyamoto, H. et Kook, Y.H.** (2003) Detection and identification of *Legionella pneumophila* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Microbiological Methods* 54, 325-337.
- Ko, K.S., Lee, H.K., Park, M.Y., Park, M.S., Lee, K.H., Woo, S.Y., Yun, Y.J. et Kook, Y.H.** (2002) Population genetic structure of *Legionella pneumophila* inferred from RNA polymerase gene (*rpoB*) and DotA gene (*dotA*) sequences. *Journal of Bacteriology* 184, 2123-2130.
- Kohler, R., Bubert, A., Goebel, W., Steinert, M., Hacker, J. et Bubert, B.** (2000) Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in *Legionella pneumophila*. *Molecular and General Genetics* 262, 1060-1069.
- Kohler, R., Fanghanel, J., Konig, B., Luneberg, E., Frosch, M., Rahfeld, J.U., Hilgenfeld, R., Fischer, G., Hacker, J. et Steinert, M.** (2003) Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 71, 4389-4397.
- Koide, M., Miyata, T., Nukina, M., Teramoto, T., Nakanishi, H., Kamiki, T., Umeda, B. et Nakai, H.** (1989) [A strain of *Pseudomonas vesicularis* isolated from shower hose which supports the multiplication of *Legionella*]. *Kansenshogaku Zasshi* 63, 1160-1164.
- Komano, T., Yoshida, T., Narahara, K. et Furuya, N.** (2000) The transfer region of Inc11 plasmid R64: similarities between R64 *tra* and *Legionella icm/dot* genes. *Molecular Microbiology* 35, 1348-1359.
- Kooistra, O., Luneberg, E., Lindner, B., Knirel, Y.A., Frosch, M. et Zahringer, U.** (2001) Complex O-acetylation in *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Evidence for two genes involved in 8-O-acetylation of legionaminic acid. *Biochemistry* 40, 7630-7640.
- Kotetishvili, M., Stine, O.C., Chen, Y., Kreger, A., Sulakvelidze, A., Sozhamannan, S. et Morris Jr, J.G., Jr.** (2003) Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2191-2196.
- Kramer, M.H., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L. et Juranek, D.D.** (1996) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1993-1994. *MMWR CDC Surveillance Summaries* 45, 1-33.

- Krinos, C., High, A.S. et Rodgers, F.G.** (1999) Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *Journal of Applied Microbiology* 86, 237-244.
- Kuchta, J.M., Navratil, J.S., Shepherd, M.E., Wadowsky, R.M., Dowling, J.N., States, S.J. et Yee, R.B.** (1993) Impact of chlorine and heat on the survival of *Hartmannella vermiformis* and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4096-4100.
- Kuchta, J.M., States, S.J., McGlaughlin, J.E., Overmeyer, J.H., Wadowsky, R.M., McNamara, A.M., Wolford, R.S. et Yee, R.B.** (1985) Enhanced chlorine resistance of tap water-adapted *Legionella pneumophila* as compared with agar medium-passaged strains. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 21-26.
- Kuehn, M., Hausner, M., Bungartz, H.J., Wagner, M., Wilderer, P.A. et Wuertz, S.** (1998) Automated confocal laser scanning microscopy and semiautomated image processing for analysis of biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4115-4127.
- Kuhn, I., Allestam, G., Huys, G., Janssen, P., Kersters, K., Krovacek, K. et Stenstrom, T.A.** (1997) Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2708-2715.
- Kuroki, T., Sata, S., Yamai, S., Yagita, K., Katsube, Y. et Endo, T.** (1998a) [Occurrence of free-living amoebae and *Legionella* in whirlpool bathes]. *Kansenshogaku Zasshi* 72, 1056-1063.
- Kuroki, T., Yagita, K., Yabuuchi, E., Agata, K., Ishima, T., Katsube, Y. et Endo, T.** (1998b) [Isolation of *Legionella* and free-living amoebae at hot spring spas in Kanagawa, Japan]. *Kansenshogaku Zasshi* 72, 1050-1055.
- La Scola, B. et Raoult, D.** (2001a) Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clinical Microbiology and Infection* 7, 75-79.
- La Scola, B., Barrassi, L. et Raoult, D.** (2000) Isolation of new fastidious alpha-*Proteobacteria* and *Afipia felis* from hospital water supplies by direct plating and amoebal co-culture procedures. *FEMS Microbiology Ecology* 34, 129-137.
- La Scola, B., Mezi, L., Weiller, P.J. et Raoult, D.** (2001b) Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 365-366.
- La Scola, B., Mallet, M.N., Grimont, P.A. et Raoult, D.** (2003a) *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 15-20.
- La Scola, B., Boyadjiev, I., Greub, G., Khamis, A., Martin, C. et Raoult, D.** (2003b) Amoeba-resisting bacteria and ventilator-associated pneumonia. *Emerging Infectious Diseases* 9, 815-821.
- La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.M. et Raoult, D.** (2003c) A giant virus in amoebae. *Science* 299, 2033.
- Landers, P., Kerr, K.G., Rowbotham, T.J., Tipper, J.L., Keig, P.M., Ingham, E. et Denton, M.** (2000) Survival and growth of *Burkholderia cepacia* within the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19, 121-123.
- Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S., Hardman, A., Downie, J.A., O'Gara, F. et Williams, P.** (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl) homoserine lactone, via *hdtS*, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146, 2469-2480.
- Lawrence, C., Ronco, E., Dubrou, S., Leclercq, R., Nauciel, C. et Matsiota-Bernard, P.** (1999a) Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the nosocomial environment by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Medical Microbiology* 48, 327-333.

- Lawrence, C., Reyrolle, M., Dubrou, S., Forey, F., Decludt, B., Goulvestre, C., Matsiota-Bernard, P., Etienne, J. et Nauciel, C.** (1999b) Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2652-2655.
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W. et Kwong, Y.T.J.** (1998) Natural attenuation of aqueous metal contamination by an algal mat. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 825-832.
- Le Dantec, C., Duguet, J.P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. et Vincent, V.** (2002) Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5318-5325.
- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D. et Lee, R.G.** (1988) Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2492-2499.
- LeChevallier, M.W., Norton, W.D. et Lee, R.G.** (1991a) *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2617-2621.
- LeChevallier, M.W., Norton, W.D. et Lee, R.G.** (1991b) Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2610-2616.
- LeChevallier, M.W., Schulz, W. et Lee, R.G.** (1991c) Bacterial nutrients in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 857-862.
- LeChevallier, M.W., Welch, N.J. et Smith, D.B.** (1996) Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2201-2211.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L. et Dei-Cas, E.** (2002) Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews in Microbiology* 28, 371-409.
- Lee, J.V. et West, A.A.** (1991) Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 20, 121S-129S.
- Lee, J.V., Surman, S.B., Kirby, A. et Seddon, F.** (2002a) Nine years experience of novel strategies for *Legionella* control in a large teaching hospital. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. pp. 398-401. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. et Calderon, R.L.** (2002b) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. *MMWR Surveillance Summaries* 51, 1-47.
- Lehtola, M.J., Miettinen, I.T. et Martikainen, P.J.** (2002) Biofilm formation in drinking water affected by low concentrations of phosphorus. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 494-499.
- Leluc, O., Doucet, V., Petit, P., Thuret, I. et Devred, P.** (2000) [*Legionella pneumophila*: unusual lung and hepatic manifestations]. *Journal de Radiologie* 81, 241-242.
- Leoni, E. et Legnani, P.P.** (2001) Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *Journal of Applied Microbiology* 90, 27-33.
- Leriche, V., Briandet, R. et Carpentier, B.** (2003) Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental Microbiology* 5, 64-71.
- Levi, K., Smedley, J. et Towner, K.J.** (2003) Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in hospital and environmental water samples. *Clinical Microbiology and Infection* 9, 754-758.
- Levy, D.A., Bens, M.S., Craun, G.F., Calderon, R.L. et Herwaldt, B.L.** (1998) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1995-1996. *MMWR CDC Surveillance Summaries* 47, 1-34.
- Li, H., Finch, G.R., Smith, D.W. et Belosevic, M.** (2001a) Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone and chlorine. *Water Research* 35, 4339-4348.

- Li, Y.H., Lau, P.C., Lee, J.H., Ellen, R.P. et Cvitkovitch, D.G. (2001b) Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *Journal of Bacteriology* 183, 897-908.
- Licht, T.R., Christensen, B.B., Krogfelt, K.A. et Molin, S. (1999) Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology* 145, 2615-2622.
- Lieberman, D., Dvoskin, B., Lieberman, D.V., Kahane, S. et Friedman, M.G. (2002) Serological evidence of acute infection with the *Chlamydia*-like microorganism *Simkania negevensis* (Z) in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21, 307-309.
- Liles, M.R., Scheel, T.A. et Cianciotto, N.P. (2000) Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* 182, 749-757.
- Lin, Y.E., Vidic, R.D., Stout, J.E. et Yu, V.L. (1998) *Legionella* in water distribution systems. *Journal AWWA* 90, 112-121.
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R. et Zhang, L.H. (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology* 47, 849-860.
- Lin, Y.S., Vidic, R.D., Stout, J.E. et Yu, V.L. (2002) Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2711-2715.
- Lisle, J.T., Broadaway, S.C., Prescott, A.M., Pyle, B.H., Fricker, C. et McFeters, G.A. (1998) Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4658-4662.
- Liu, Z., Stout, J.E., Boldin, M., Rugh, J., Diven, W.F. et Yu, V.L. (1998) Intermittent use of copper-silver ionization for *Legionella* control in water distribution systems: a potential option in buildings housing individuals at low risk of infection. *Clinical Infectious Diseases* 26, 138-140.
- Liu, Z., Stout, J.E., Tedesco, L., Boldin, M., Hwang, C., Diven, W.F. et Yu, V.L. (1994) Controlled evaluation of copper-silver ionization in eradicating *Legionella pneumophila* from a hospital water distribution system. *Journal of Infectious Diseases* 169, 919-922.
- Lloyd, D., Turner, N.A., Khunkitti, W., Hann, A.C., Furr, J.R. et Russell, A.D. (2001) Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 11-16.
- Lo Presti, F., Riffard, S., Vandenesch, F. et Etienne, J. (1998) Identification of *Legionella* species by random amplified polymorphic DNA profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 3193-3197.
- Lundemose, A.G., Birkelund, S., Fey, S.J., Larsen, P.M. et Christiansen, G. (1991) *Chlamydia trachomatis* contains a protein similar to the *Legionella pneumophila mip* gene product. *Molecular Microbiology* 5, 109-115.
- Luneberg, E., Mayer, B., Daryab, N., Kooistra, O., Zahringer, U., Rohde, M., Swanson, J. et Frosch, M. (2001) Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 39, 1259-1271.
- Luneberg, E., Zahringer, U., Knirel, Y.A., Steinmann, D., Hartmann, M., Steinmetz, I., Rohde, M., Kohl, J. et Frosch, M. (1998) Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. *Journal of Experimental Medicine* 188, 49-60.
- Luttichau, H.R., Vinther, C., Uldum, S.A., Moller, J., Faber, M. et Jensen, J.S. (1998) An outbreak of Pontiac fever among children following use of a whirlpool. *Clinical Infectious Diseases* 26, 1374-1378.
- Ly, T.M. et Muller, H.E. (1990) Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *Journal of Medical Microbiology* 33, 51-54.
- Lye, D., Fout, G.S., Crout, S.R., Danielson, R., Thio, C.L. et Paszko-Kolva, C.M. (1996) Survey of ground, surface, and potable waters for the presence of *Legionella* species by

- enviroamp PCR *Legionella* kit, culture, and immunofluorescent staining. *Water Research* 31, 287-293.
- Lynch, D., Fieser, N., Glogglar, K., Forsbach-Birk, V. et Marre, R.** (2003) The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiology Letters* 219, 241-248.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E. et Williams, P.** (2002) The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology* 4, 18-28.
- Malan, A.K., Martins, T.B., Jaskowski, T.D., Hill, H.R. et Litwin, C.M.** (2003) Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3060-3063.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. et Schleifer, K.-H.** (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 593-600.
- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.H. et Stenstrom, T.A.** (1993) In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2293-2298.
- Manz, W., Amann, R., Szewzyk, R., Szewzyk, U., Stenstrom, T.A., Hutzler, P. et Schleifer, K.H.** (1995) In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 141, ( Pt 1) 29-39.
- Marciano-Cabral, F. et Cabral, G.** (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 273-307.
- Marolda, C.L., Hauröder, B., John, M.A., Michel, R. et Valvano, M.A.** (1999) Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology* 145 ( Pt 7), 1509-1517.
- Marra, A., Blander, S.J., Horwitz, M.A. et Shuman, H.A.** (1992) Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9607-9611.
- Marshall, K.C., Stout, R. et Mitchell, R.** (1971) Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology* 68, 337-348.
- Marston, B.J., Lipman, H.B. et Breiman, R.F.** (1994) Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Archives of Internal Medicine* 154, 2417-2422.
- Marston, B.J., Plouffe, J.F., File, T.M., Hackman, B.A., Salstrom, S.J., Lipman, H.B., Kolczak, M.S. et Breiman, R.F.** (1997) Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization - Results of a population-based active surveillance study in Ohio. *Archives of Internal Medicine* 157, 1709-1718.
- Martinelli, D., Bachofen, R. et Brandl, H.** (2002) Effect of medium composition, flow rate, and signaling compounds on the formation of soluble extracellular materials by biofilms of *Chromobacterium violaceum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 278-283.
- Martiny, A.C., Jorgensen, T.M., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. et Molin, S.** (2003) Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6899-6907.
- Maruta, K., Ogawa, M., Miyamoto, H., Izu, K. et Yoshida, S.I.** (1998) Entry and intracellular localization of *Legionella dumoffii* in Vero cells. *Microbial Pathogenesis* 24, 65-73.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G. et Bauer, W.D.** (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1444-1449.

- Matsunaga, K., Klein, T.W., Friedman, H. et Yamamoto, Y.** (2001) *Legionella pneumophila* replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokine formation by epigallocatechin gallate, a major form of tea catechins. *Infection and Immunity* 69, 3947-3953.
- Matthews, M. et Roy, C.R.** (2000) Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* lcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infection and Immunity* 68, 3971-3982.
- Matz, C. et Jurgens, K.** (2003) Interaction of nutrient limitation and protozoan grazing determines the phenotypic structure of a bacterial community. *Microbial Ecology* 45, 384-398.
- Matz, C., Deines, P. et Jurgens, K.** (2002) Phenotypic variation in *Pseudomonas* sp. CM10 determines microcolony formation and survival under protozoan grazing. *FEMS Microbiology Ecology* 39, 57-65.
- Mazur, T., Hadas, E. et Iwanicka, I.** (1995) The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Tropical Medicine and Parasitology* 46, 106-108.
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. et Williams, P.** (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143, 3703-3711.
- McLean, R.J., Whiteley, M., Stickler, D.J. et Fuqua, W.C.** (1997) Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 154, 259-263.
- McNab, R., Ford, S.K., El-Sabaeny, A., Barbieri, B., Cook, G.S. et Lamont, R.J.** (2003) LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology* 185, 274-284.
- McNealy, T., Newsome, A., Johnson, R. et Berk, S.** (2002) Impact of amoebae, bacteria, and *Tetrahymena* on *Legionella pneumophila* multiplication and distribution in an aquatic environment. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. pp. 170-175. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W. et Schleifer, K.H.** (1999) Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 186-196.
- Merritt, J., Qi, F., Goodman, S.D., Anderson, M.H. et Shi, W.** (2003) Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity* 71, 1972-1979.
- Meyer, R.D.** (1983) *Legionella* infections: a review of five years of research. *Reviews of Infectious Diseases* 5, 258-278.
- Michaud, S., Bernet, N., Roustan, M. et Delgenes, J.P.** (2003) Influence of hydrodynamic conditions on biofilm behavior in a methanogenic inverse turbulent bed reactor. *Biotechnology Progress* 19, 858-863.
- Michel, R. et Hauröder, B.** (1997) Isolation of an *Acanthamoeba* strain with intracellular *Burkholderia pickettii* infection. *Zentralblatt für Bakteriologie* 285, 541-557.
- Michel, R., Burghardt, H. et Bergmann, H.** (1995a) [*Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital]. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 196, 532-544.
- Michel, R., Müller, K.D. et Schmid, E.N.** (1995b) *Ehrlichia*-like organisms (KSL1) observed as obligate intracellular parasites of *Saccamoeba* species. *Endocytobiosis and Cell Research* 11, 69-80.
- Miettinen, I.T., Vartiainen, T. et Martikainen, P.J.** (1997) Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3242-3245.
- Miller, R.D.** (1983) *Legionella pneumophila* cell envelope: permeability to hydrophobic molecules. *Current Microbiology* 9, 349-354.

- Miltner, E.C. et Bermudez, L.E.** (2000) *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 1990-1994.
- Mintz, C.S.** (1999) Gene transfer in *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection* 1, 1203-1209.
- Mireles, J.R., 2nd, Toguchi, A. et Harshey, R.M.** (2001) *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 183, 5848-5854.
- Miyamoto, H., Yoshida, S., Taniguchi, H. et Shuman, H.A.** (2003) Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of chromosomal DNA. *Journal of Bacteriology* 185, 6712-6718.
- Miyamoto, H., Jitsurong, S., Shiota, R., Maruta, K., Yoshida, S. et Yabuuchi, E.** (1997a) Molecular determination of infection source of a sporadic *Legionella pneumonia* case associated with a hot spring bath. *Microbiology and Immunology* 41, 197-202.
- Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T. et Yoshida, S.** (1997b) Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2489-2494.
- Miyamoto, M., Yamaguchi, Y. et Sasatsu, M.** (2000) Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculous mycobacteria. *Microbios* 101, 7-13.
- Molin, S. et Tolker-Nielsen, T.** (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 255-261.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Dujoy, B. et Défago, G.** (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiology Ecology* 1522, 1-11.
- Moller, S., Pedersen, A.R., Poulsen, L.K., Arvin, E. et Molin, S.** (1996) Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4632-4640.
- Molmeret, M.** (2001). Réplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* : des amibes aux macrophages. PhD Thesis. Université Claude Bernard-Lyon1, Lyon, France
- Molmeret, M., Alli, O.A., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N.P. et Kwaik, Y.A.** (2002) *icmT* is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* 70, 69-78.
- Molofsky, A.B. et Swanson, M.S.** (2003) *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Molecular Microbiology* 50, 445-461.
- Momba, M.N.B., Ndaliso, S. et Binda, M.A.** (2003) Effect of a combined chlorine-monochloramine process on the inhibition of biofilm regrowth in potable water systems. *Water Science and Technology* 3, 215-221.
- Moore, A.C., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L., Highsmith, A.K. et Juranek, D.D.** (1993) Surveillance for waterborne disease outbreaks--United States, 1991-1992. *MMWR CDC Surveillance Summaries* 42, 1-22.
- Muller, R., Kuttler, E., Lanz, C., Drewke, C. et Schmidt, K.** (1996) Isolation of a gene encoding cysteine synthase from *Flavobacterium* K3-15. *FEMS Microbiology Letters* 136, 305-308.
- Muraca, P., Stout, J.E. et Yu, V.L.** (1987) Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 447-453.
- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S. et Donlan, R.M.** (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147, 3121-3126.

- Nagai, H. et Roy, C.R.** (2003a) Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cellular Microbiology* 5, 373-383.
- Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A. et Roy, C.R.** (2002) A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* 295, 679-682.
- Nagai, T., Sobajima, H., Iwasa, M., Tsuzuki, T., Kura, F., Amemura-Maekawa, J. et Watanabe, H.** (2003b) Neonatal sudden death due to *Legionella* pneumonia associated with water birth in a domestic spa bath. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2227-2229.
- Nahapetian, K., Challemel, O., Beurtin, D., Dubrou, S., Gounon, P. et Squinazi, F.** (1991) The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems. *Research in Microbiology* 142, 677-685.
- Neef, A.** (1997). Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. PhD Thesis. Technical University Munich, Munich, Germany
- Neumeister, B., Schoniger, S., Faigle, M., Eichner, M. et Dietz, K.** (1997) Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1219-1224.
- Neumeister, B., Reiff, G., Faigle, M., Dietz, K., Northoff, H. et Lang, F.** (2000) Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 914-919.
- Newsome, A.L., Baker, R.L., Miller, R.D. et Arnold, R.R.** (1985) Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 50, 449-452.
- Nguyen, M.L. et Yu, V.L.** (1991) *Legionella* infection. *Clinics in Chest Medicine* 12, 257-268.
- Niquette, P., Servais, P. et Savoie, R.** (2000) Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Research* 34, 1952-1956.
- Niquette, P., Servais, P. et Savoie, R.** (2001) Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. *Water Research* 35, 675-682.
- Noller, A.C., McEllistrem, M.C., Stine, O.C., Morris, J.G., Jr., Boxrud, D.J., Dixon, B. et Harrison, L.H.** (2003) Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 675-679.
- Norton, C.D. et LeChevallier, M.W.** (2000) A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 268-276.
- O'Brien, S.J. et Bhopal, R.S.** (1993) Legionnaires' disease: the infective dose paradox. *Lancet* 342, 5-6.
- O'Connell, W.A., Hickey, E.K. et Cianciotto, N.P.** (1996) A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding. *Infection and Immunity* 64, 842-848.
- Ofek, I., Simpson, W.A. et Beachey, E.H.** (1982) Formation of molecular complexes between a structurally defined M protein and acylated or deacylated lipoteichoic acid of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology* 149, 426-433.
- Ofek, I., Whitnack, E. et Beachey, E.H.** (1983) Hydrophobic interactions of group A streptococci with hexadecane droplets. *Journal of Bacteriology* 154, 139-145.
- Ogawa, M., Takade, A., Miyamoto, H., Taniguchi, H. et Yoshida, S.** (2001) Morphological variety of intracellular microcolonies of *Legionella* species in Vero cells. *Microbiology and Immunology* 45, 557-562.
- Olofsson, A.C., Hermansson, M. et Elwing, H.** (2003) *N*-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4814-4822.
- Olson, B.H. et Nagy, L.A.** (1984) Microbiology of potable water. *Advances in Applied Microbiology* 30, 73-132.
- Ossewaarde, J.M. et Meijer, A.** (1999) Molecular evidence for the existence of additional members of the order *Chlamydiales*. *Microbiology* 145, 411-417.



- Osterreicher-Ravid, D., Ron, E.Z. et Rosenberg, E.** (2000) Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. *Environmental Microbiology* 2, 366-372.
- Ott, M., Messner, P., Heesemann, J., Marre, R. et Hacker, J.** (1991) Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *Journal of General Microbiology* 137, 1955-1961.
- Palmer, C.J., Tsai, Y.L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C. et Sangermano, L.R.** (1993) Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3618-3624.
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M.K., Millard, P.J., Mao, F. et Leung, W.Y.** (1999) Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47, 1179-1188.
- Park, S.R., Mackay, W.G. et Reid, D.C.** (2001) *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Research* 35, 1624-1626.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M. et Fraser, C.M.** (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13148-13153.
- Payne, N.R. et Horwitz, M.A.** (1987) Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *Journal of Experimental Medicine* 166, 1377-1389.
- Pedersen, L.L., Radulic, M., Doric, M. et Abu Kwaik, Y.** (2001) HtrA homologue of *Legionella pneumophila*: an indispensable element for intracellular infection of mammalian but not protozoan cells. *Infection and Immunity* 69, 2569-2579.
- Peplies, J., Glockner, F.O. et Amann, R.** (2003) Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1397-1407.
- Pernin, P., Pelandakis, M., Rouby, Y., Faure, A. et Siclet, F.** (1998) Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 955-959.
- Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F. et Amann, R.** (2002) Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 661-667.
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Amann, R. et Psenner, R.** (1997) Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 596-601.
- Perola, O., Kauppinen, J., Kusnetsov, J., Heikkinen, J., Jokinen, C. et Katila, M.L.** (2002) Nosocomial *Legionella pneumophila* serogroup 5 outbreak associated with persistent colonization of a hospital water system. *Apmis* 110, 863-868.
- Pine, L., George, J.R., Reeves, M.W. et Harrell, W.K.** (1979) Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 9, 615-626.
- Polesky, A.H., Ross, J.T., Falkow, S. et Tompkins, L.S.** (2001) Identification of *Legionella pneumophila* genes important for infection of amoebas by signature-tagged mutagenesis. *Infection and Immunity* 69, 977-987.
- Poulsen, L.K., Ballard, G. et Stahl, D.A.** (1993) Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1354-1360.

- Pourcel, C., Vidgop, Y., Ramisse, F., Vergnaud, G. et Tram, C.** (2003) Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1819-1826.
- Pratt, L.A. et Kolter, R.** (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* 30, 285-293.
- Purevdorj, B., Costerton, J.W. et Stoodley, P.** (2002) Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4457-4464.
- Rangel-Frausto, M.S., Rhomberg, P., Hollis, R.J., Pfaller, M.A., Wenzel, R.P., Helms, C.M. et Herwaldt, L.A.** (1999) Persistence of *Legionella pneumophila* in a hospital's water system: a 13-year survey. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 20, 793-797.
- Ratcliff, R.M., Lanser, J.A., Manning, P.A. et Heuzenroeder, M.W.** (1998) Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1560-1567.
- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M. et Gram, L.** (2001) Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiological Methods* 44, 239-251.
- Rechnitzer, C. et Blom, J.** (1989) Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *Apmis* 97, 105-114.
- Reeves, M.W., Pine, L., Hutner, S.H., George, J.R. et Harrell, W.K.** (1981) Metal requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 13, 688-695.
- Regan, J.M., Harrington, G.W. et Noguera, D.R.** (2002) Ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial communities in a pilot-scale chloraminated drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 73-81.
- Regan, J.M., Harrington, G.W., Baribeau, H., De Leon, R. et Noguera, D.R.** (2003) Diversity of nitrifying bacteria in full-scale chloraminated distribution systems. *Water Research* 37, 197-205.
- Reischl, U., Linde, H.J., Lehn, N., Landt, O., Barratt, K. et Wellinghausen, N.** (2002) Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3814-3817.
- Rice, A.R., Hamilton, M.A. et Camper, A.K.** (2003) Movement, replication, and emigration rates of individual bacteria in a biofilm. *Microbial Ecology* 45, 163-172.
- Richardson, I.R.** (1990) The incidence of *Bdellovibrio* spp. in man-made water systems: coexistence with legionellas. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 134-140.
- Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E. et Handley, P.S.** (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology* 11, 94-100.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S. et Eberl, L.** (2001) *N*-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147, 3249-3262.
- Riffard, S., Lo Presti, F., Vandenesch, F., Forey, F., Reyrolle, M. et Etienne, J.** (1998a) Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 161-167.
- Riffard, S., Douglass, S., Brooks, T., Springthorpe, S., Fillion, L.G. et Sattar, S.A.** (2001) Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Science and Technology* 43, 99-102.
- Riffard, S., Lo Presti, F., Normand, P., Forey, F., Reyrolle, M., Etienne, J. et Vandenesch, F.** (1998b) Species identification of *Legionella* via intergenic 16S-23S ribosomal spacer PCR analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 723-730.

- Ristroph, J.D., Hedlund, K.W. et Gowda, S.** (1981) Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth. *Journal of Clinical Microbiology* 13, 115-119.
- Robey, M. et Cianciotto, N.P.** (2002) *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infection and Immunity* 70, 5659-5669.
- Rodriguez-Zaragoza, S.** (1994) Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* 20, 225-241.
- Rogers, J. et Keevil, C.W.** (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2326-2330.
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. et Keevil, C.W.** (1994a) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1585-1592.
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. et Keevil, C.W.** (1994b) Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1842-1851.
- Rohr, U., Weber, S., Selenka, F. et Wilhelm, M.** (2000) Impact of silver and copper on the survival of amoebae and ciliated protozoa in vitro. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203, 87-89.
- Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F. et Wilhelm, M.** (1998) Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1822-1824.
- Rohr, U., Senger, M., Selenka, F., Turley, R. et Wilhelm, M.** (1999) Four years of experience with silver-copper ionization for control of *Legionella* in a german university hospital hot water plumbing system. *Clinical Infectious Diseases* 29, 1507-1511.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. et Schleifer, K.H.** (1994) In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides [published erratum appears in *Microbiology* 1995 May;141(Pt 5):1267]. *Microbiology* 140, ( Pt 10) 2849-2858.
- Ron, E.Z. et Rosenberg, E.** (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 3, 229-236.
- Ronn, R., McCaig, A.E., Griffiths, B.S. et Prosser, J.I.** (2002) Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6094-6105.
- Rossier, O. et Cianciotto, N.P.** (2001) Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 69, 2092-2098.
- Rowbotham, T.J.** (1980a) Pontiac fever explained? [letter]. *Lancet* 2, 969-969.
- Rowbotham, T.J.** (1980b) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology* 33, 1179-1183.
- Rowbotham, T.J.** (1986) Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci* 22, 678-689.
- Rowbotham, T.J.** (1993) *Legionella*-like amoebal pathogens. In *Legionella, Current Status and Emerging Perspectives* ed. Barbaree, J.M., Breiman, R.F., et Dufour, A.P. pp. 137-140. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Roy, C.R. et Isberg, R.R.** (1997) Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infection and Immunity* 65, 571-578.
- Roy, C.R., Berger, K.H. et Isberg, R.R.** (1998) *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosomal trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Molecular Microbiology* 28, 663-674.
- Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A. et Hamood, A.N.** (2000) The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection* 2, 1721-1731.

- Rupper, A. et Cardelli, J.** (2001) Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1525, 205-216.
- Sadosky, A.B., Wiater, L.A. et Shuman, H.A.** (1993) Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infection and Immunity* 61, 5361-5373.
- Sanden, G.N., Morrill, W.E., Fields, B.S., Breiman, R.F. et Barbaree, J.M.** (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2001-2004.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. et Davies, D.G.** (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* 184, 1140-1154.
- Saunders, N.A., Harrison, T.G., Haththotuwa, A. et Taylor, A.G.** (1991) A comparison of probes for restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Medical Microbiology* 35, 152-158.
- Sawyer, L.K. et Hermanowicz, S.W.** (2000) Detachment of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa* due to variations in nutrient supply. *Water Science and Technology* 41, 139-145.
- Schaefer, A.L., Taylor, T.A., Beatty, J.T. et Greenberg, E.P.** (2002) Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *Journal of Bacteriology* 184, 6515-6521.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G. et Bassler, B.L.** (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology* 41, 463-476.
- Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.E. et Streit, W.R.** (2003) Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7298-7309.
- Schmid, E.N., Müller, K.D. et Michel, R.** (2001) Evidence for bacteriophages within *Neochlamydia hartmannellae*, an obligate endoparasitic bacterium of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Int. J. Endocytob. Cell Res.* 14, 115-119.
- Schoenen, D.** (2002) Role of disinfection in suppressing the spread of pathogens with drinking water: possibilities and limitations. *Water Research* 36, 3874-3888.
- Schwartz, T., Hoffman, S. et Obst, U.** (1998) Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Research* 32, 2787-2797.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B. et Obst, U.** (2003) Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 325-335.
- Segal, G. et Shuman, H.A.** (1997) Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 65, 5057-5066.
- Segal, G. et Shuman, H.A.** (1999a) *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infection and Immunity* 67, 2117-2124.
- Segal, G. et Shuman, H.A.** (2002) Genetic analysis of *Legionella pneumophila* intracellular multiplication in human and protozoan hosts. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Segal, G., Purcell, M. et Shuman, H.A.** (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1669-1674.

- Segal, G., Russo, J.J. et Shuman, H.A.** (1999b) Relationships between a new type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 34, 799-809.
- Selander, R.K., McKinney, R.M., Whittam, T.S., Bibb, W.F., Brenner, D.J., Nolte, F.S. et Pattison, P.E.** (1985) Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* 163, 1021-1037.
- Sexton, J.A. et Vogel, J.P.** (2002) Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic* 3, 178-185.
- Shinozawa, Y., Matsumoto, T., Uchida, K., Tsujimoto, S., Iwakura, Y. et Yamaguchi, K.** (2002) Role of interferon-gamma in inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*. *Journal of Medical Microbiology* 51, 225-230.
- Sibille, I.** (1998) [Biological stability in drinking water distribution systems: a review]. *L'Annee Biologique* 37, 117-161.
- Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L. et Block, J.C.** (1998) Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 197-202.
- Sibille, I., Mathieu, L., Paquin, J.L., Gatel, D. et Block, J.C.** (1997) Microbial characteristics of a distribution system fed with nanofiltered drinking water. *Water Research* 31, 2318-2326.
- Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Posch, T., Hartman, P., Nedoma, J. et Psenner, R.** (1997) Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 587-595.
- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J. et Greenberg, E.P.** (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407, 762-764.
- Singh, R., Stine, O.C., Smith, D.L., Spitznagel, J.K., Jr., Labib, M.E. et Williams, H.N.** (2003) Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3412-3420.
- Smith, H.V. et Rose, J.B.** (1998) Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today* 14, 14-22.
- Smith, R.S., Harris, S.G., Phipps, R. et Iglewski, B.** (2002) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *Journal of Bacteriology* 184, 1132-1139.
- Smith-Somerville, H.E., Huryn, V.B., Walker, C. et Winters, A.L.** (1991) Survival of *Legionella pneumophila* in the cold-water ciliate *Tetrahymena vorax*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2742-2749.
- Solomon, J.M., Rupper, A., Cardelli, J.A. et Isberg, R.R.** (2000) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infection and Immunity* 68, 2939-2947.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P. et Kaper, J.B.** (2003) Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8951-8956.
- Srikanth, S. et Berk, S.G.** (1993) Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3245-3249.
- Srinivasan, A., Bova, G., Ross, T., Mackie, K., Paquette, N., Merz, W. et Perl, T.M.** (2003) A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control *Legionella* species in a hospital water supply. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 24, 575-579.
- States, S.J., Conley, L.F., Ceraso, M., Stephenson, T.E., Wolford, R.S., Wadowsky, R.M., McNamara, A.M. et Yee, R.B.** (1985) Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 1149-1154.
- Steele, T.W. et McLennan, A.M.** (1996) Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1081-1083.

- Steele, T.W., Lanser, J. et Sangster, N.** (1990) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 49-53.
- Steenbergen, J.N., Shuman, H.A. et Casadevall, A.** (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 11, 11.
- Steinert, M.** (1996). Studien zur Interaktion von *Legionella pneumophila* und professionell phagozytierenden Zellen. Dissertation. Universität Würzburg, Germany
- Steinert, M., Emody, L., Amann, R. et Hacker, J.** (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2047-2053.
- Steinert, M., Ockert, G., Luck, C. et Hacker, J.** (1998a) Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralblatt für Bakteriologie* 288, 331-342.
- Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B. et Quinn, F.** (1998b) *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2256-2261.
- Steinert, M., Flugel, M., Schuppler, M., Helbig, J.H., Supriyono, A., Proksch, P. et Luck, P.C.** (2001) The Lly protein is essential for *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters* 203, 41-47.
- Steinmoen, H., Knutsen, E. et Havarstein, L.S.** (2002) Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7681-7686.
- Stickler, D.J., Morris, N.S., McLean, R.J. et Fuqua, C.** (1998) Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3486-3490.
- Stone, B.J. et Abu Kwaik, Y.** (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* 66, 1768-1775.
- Stone, B.J. et Kwaik, Y.A.** (1999) Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *Journal of Bacteriology* 181, 1395-1402.
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D. et Lappin-Scott, H.M.** (1999) The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environmental Microbiology* 1, 447-455.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S. et Klapper, I.** (2002) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29, 361-367.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. et Costerton, J.W.** (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5608-5613.
- Stott, R., May, E., Ramirez, E. et Warren, A.** (2003) Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. *Water Science and Technology* 47, 77-83.
- Stout, J.E., Yu, V.L. et Best, M.G.** (1985) Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 221-228.
- Sturgill-Koszycki, S. et Swanson, M.S.** (2000) *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1261-1272.
- Surette, M.G. et Bassler, B.L.** (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7046-7050.
- Surette, M.G., Miller, M.B. et Bassler, B.L.** (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for

autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1639-1644.

**Surman, S., Morton, G., Keevil, B. et Fitzgeorge, R.** (2002) *Legionella pneumophila* proliferation is not dependent on intracellular replication. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N.P., Fields, B., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. pp. 86-89. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

**Surman, S.B., Morton, L.H.G., Skinner, A., Fitzgeorge, R.B. et Keevil, C.W.** (1999) Growth of *Legionella pneumophila* is not dependent on intracellular replication. In *Biofilms in the Aquatic Environment* ed. Keevil, C.W., Godfree, A., Holt, D.H., et Dow, C.S. pp. 160-170. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

**Szenasi, Z., Endo, T., Yagita, K. et Nagy, E.** (1998) Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *Journal of Medical Microbiology* 47, 5-16.

**Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W. et Schleifer, K.H.** (2000) Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology* 54, 81-127.

**Ta, A.C., Stout, J.E., Yu, V.L. et Wagener, M.M.** (1995) Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2118-2123.

**Taga, M.E. et Bassler, B.L.** (2003) Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 Suppl 2, 14549-14554.

**Tall, B.D., Williams, H.N., George, K.S., Gray, R.T. et Walch, M.** (1995) Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 647-654.

**Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschioli, M.L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P. et Letesson, J.J.** (2002) Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity* 70, 3004-3011.

**Taylor, R.H., Falkinham, J.O., 3rd, Norton, C.D. et LeChevallier, M.W.** (2000) Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1702-1705.

**Taylor, S.J., Ahonen, L.J., de Leij, F.A. et Dale, J.W.** (2003) Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4316-4319.

**Teitzel, G.M. et Parsek, M.R.** (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2313-2320.

**Terzieva, S., Donnelly, J., Ulevicius, V., Grinshpun, S., Willeke, K., Stelma, G. et Brenner, K.** (1996) Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2264-2272.

**Tettelin, H., Saunders, N.J., Heidelberg, J., Jeffries, A.C., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Ketchum, K.A., Hood, D.W., Peden, J.F., Dodson, R.J., Nelson, W.C., Gwinn, M.L., DeBoy, R., Peterson, J.D., Hickey, E.K., Haft, D.H., Salzberg, S.L., White, O., Fleischmann, R.D., Dougherty, B.A., Mason, T., Ciecko, A., Parksey, D.S., Blair, E., Cittone, H., Clark, E.B., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Khouri, H., Qin, H., Vamathevan, J., Gill, J., Scarlato, V., Masignani, V., Pizza, M., Grandi, G., Sun, L., Smith, H.O., Fraser, C.M., Moxon, E.R., Rappuoli, R. et Venter, J.C.** (2000) Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287, 1809-1815.

**Theron, J. et Cloete, T.E.** (2002) Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. *Critical Reviews in Microbiology* 28, 1-26.

**Thom, S., Warhurst, D. et Drasar, B.S.** (1992) Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *Journal of Medical Microbiology* 36, 303-306.

**Thomas, V., Rochet, V., Boureau, H., Ekstrand, C., Bulteau, S., Dore, J., Collignon, A. et Bourlioux, P.** (2002) Molecular characterization and spatial analysis of a simplified gut

- microbiota displaying colonization resistance against *Clostridium difficile*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 14, 203-210.
- Tiefenbrunner, F., Arnold, A., Dierich, M.P. et Emde, K.** (1993) Occurrence and distribution of *Legionella pneumophila* in water systems of central european private homes. In *Legionella, Current Status and Emerging Perspectives* ed. Barbaree, J.M., Breiman, R.F., et Dufour, A.P. pp. 235-238. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Tilney, L.G., Harb, O.S., Connelly, P.S., Robinson, C.G. et Roy, C.R.** (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *Journal of Cell Science* 114, 4637-4650.
- Tison, D.L. et Seidler, R.J.** (1983) *Legionella* incidence and density in potable drinking water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 337-339.
- Tison, D.L., Pope, D.H., Cherry, W.B. et Fliermans, C.B.** (1980) Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology* 39, 456-459.
- Tolker-Nielsen, T., Larsen, M.H., Kyed, H. et Molin, S.** (1997) Effects of stress treatments on the detection of *Salmonella typhimurium* by in situ hybridization. *International Journal of Food Microbiology* 35, 251-258.
- Tomov, A., Kassovsky, V., Chorbadijska, L., Tsvetkova, E., Tsanev, N. et Vencheva, Z.** (1982) Lytic activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* against bacteria of the family Legionellaceae. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene [A]* 252, 96-100.
- Tomov, A.T., Tsvetkova, E.D., Tomova, I.A., Michailova, L.I. et Kassovski, V.K.** (1999) Persistence and multiplication of obligate anaerobe bacteria in amoebae under aerobic conditions. *Anaerobe* 5, 19-23.
- Toze, S., Sly, L.I., MacRae, I.C. et Fuerst, J.A.** (1990) Inhibition of growth of *Legionella* species by heterotrophic plate count bacteria isolated from chlorinated drinking water. *Current Microbiology* 21, 139-143.
- Turner, N.A., Biagini, G.A. et Lloyd, D.** (1997) Anaerobiosis-induced differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiology Letters* 157, 149-153.
- Tyndall, R.L. et Domingue, E.L.** (1982) Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 954-959.
- Tyndall, R.L., Vass, A.A. et Fliermans, C.B.** (1993) Mixed bacterial populations derived from *Legionella*-infected free-living amoebae. In *Legionella, Current Status and Emerging Perspectives* ed. Barbaree, J.M., Breiman, R.F., et Dufour, A.P. pp. 142-145. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Van Belkum, A., Maas, H., Verbrugh, H. et Van Leeuwen, N.** (1996) Serotyping, ribotyping, PCR-mediated ribosomal 16S-23S spacer analysis and arbitrarily primed PCR for epidemiological studies on *Legionella pneumophila*. *Research in Microbiology* 147, 405-413.
- van der Kooij, D., Veenendaal, H.R., Slaats, N.P.G. et Vonk, D.** (2002) Biofilm formation and multiplication of *Legionella* on synthetic pipe materials in contact with treated water under static and dynamic conditions. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. pp. 176-180. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- van der Zee, A., Peeters, M., de Jong, C., Verbakel, H., Crielaard, J.W., Claas, E.C. et Templeton, K.E.** (2002) Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for *Legionella* PCR are not suitable for diagnostic purposes. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1126.
- van Der Zee, A., Verbakel, H., de Jong, C., Pot, R., Bergmans, A., Peeters, M., Schneeberger, P. et Schellekens, J.** (2002) Novel PCR-probe assay for detection of and discrimination between *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1124-1125.
- Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S. et Abu Kwaik, Y.** (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *Journal of Experimental Medicine* 186, 537-547.



- Verissimo, A., Morais, P.V., Diogo, A., Gomes, C. et da Costa, M.S.** (1996) Characterization of *Legionella* species by numerical analysis of whole-cell protein electrophoresis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 41-49.
- Vincke, E., Boon, N. et Verstraete, W.** (2001) Analysis of the microbial communities on corroded concrete sewer pipes--a case study. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 776-785.
- Visca, P., Goldoni, P., Luck, P.C., Helbig, J.H., Cattani, L., Giltri, G., Bramati, S. et Castellani Pastoris, M.** (1999) Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2189-2196.
- Viswanathan, V.K., Edelstein, P.H., Pope, C.D. et Cianciotto, N.P.** (2000) The *Legionella pneumophila* *iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infection and Immunity* 68, 1069-1079.
- Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K. et Isberg, R.R.** (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279, 873-876.
- Volk, C.J. et LeChevallier, M.W.** (1999) Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4957-4966.
- Wadowsky, R.M. et Yee, R.B.** (1983) Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 1447-1449.
- Wadowsky, R.M. et Yee, R.B.** (1985) Effect of non-*Legionellaceae* bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1206-1210.
- Wadowsky, R.M., Yee, R.B., Mezmar, L., Wing, E.J. et Dowling, J.N.** (1982) Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 1104-1110.
- Wadowsky, R.M., Butler, L.J., Cook, M.K., Verma, S.M., Paul, M.A., Fields, B.S., Keleti, G., Sykora, J.L. et Yee, R.B.** (1988) Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2677-2682.
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. et Iglewski, B.H.** (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *Journal of Bacteriology* 185, 2080-2095.
- Walker, J.T., Roberts, A.D., Lucas, V.J., Roper, M.A. et Brown, R.G.** (1999) Quantitative assessment of biocide control of biofilms including *Legionella pneumophila* using total viable counts, fluorescence microscopy, and image analysis. *Methods in Enzymology* 310, 629-637.
- Walker, J.T., Mackerness, C.W., Mallon, D., Makin, T., Williets, T. et Keevil, C.W.** (1995) Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water system by chlorine dioxide. *Journal of Industrial Microbiology* 15, 384-390.
- Wallner, G., Amann, R. et Beisker, W.** (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136-143.
- Watarai, M., Derre, I., Kirby, J., Gowney, J.D., Dietrich, W.F. et Isberg, R.R.** (2001) *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse *Lgn1* locus. *Journal of Experimental Medicine* 194, 1081-1096.
- Waterer, G.W., Baselski, V.S. et Wunderink, R.G.** (2001) *Legionella* and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *American Journal of Medicine* 110, 41-48.
- Webb, D., Hamilton, M.A., Harkin, G.J., Lawrence, S., Camper, A.K. et Lewandowski, Z.** (2003a) Assessing technician effects when extracting quantities from microscope images. *Journal of Microbiological Methods* 53, 97-106.

- Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. et Kjelleberg, S.** (2003b) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology* 185, 4585-4592.
- Weekers, P.H.H., Bodelier, P.L.E., Wijen, J.P.H. et Vogels, G.D.** (1993) Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2317-2319.
- Wellinghausen, N., Frost, C. et Marre, R.** (2001) Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time lightcycler pcr. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3985-3993.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. et Salmond, G.P.** (2001) Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 365-404.
- Wiater, L.A., Dunn, K., Maxfield, F.R. et Shuman, H.A.** (1998) Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 66, 4450-4460.
- Wieland, H., Faigle, M., Lang, F., Northoff, H. et Neumeister, B.** (2002) Regulation of the *Legionella mip*-promotor during infection of human monocytes. *FEMS Microbiology Letters* 212, 127-132.
- Williams, M.M. et Braun-Howland, E.B.** (2003) Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5463-5471.
- Winiacka-Krusnell, J. et Linder, E.** (2001) Bacterial infections of free-living amoebae. *Research in Microbiology* 152, 613-619.
- Winiacka-Krusnell, J., Wreiber, K., von Euler, A., Engstrand, L. et Linder, E.** (2002) Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 34, 253-256.
- Winn, W.C., Jr.** (1988) Legionnaires disease: historical perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 1, 60-81.
- Wright, J.B., Ruseska, I., Athar, M.A., Corbett, S. et Costerton, J.W.** (1989) *Legionella pneumophila* grows adherent to surfaces in vitro and in situ. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 10, 408-415.
- Wu, H., Song, Z., Givskov, M. et Hoiby, N.** (2004) Effects of quorum-sensing on immunoglobulin G responses in a rat model of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection* 6, 34-37.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Heydorn, A., Mathee, K., Moser, C., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N. et Givskov, M.** (2000) Detection of *N*-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146, 2481-2493.
- Wullings, B., Voogt, R., Veenendaal, H. et van der Kooij, D.** (2002) The fluorescent *in situ* hybridization test in comparison with culture for detection of *Legionella pneumophila* in water samples. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., et Lück, P.C. pp. 263-266. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Xavier, J.B., White, D.C. et Almeida, J.S.** (2003a) Automated biofilm morphology quantification from confocal laser scanning microscopy imaging. *Water Science and Technology* 47, 31-37.
- Xavier, J.B., Schnell, A., Wuertz, S., Palmer, R., White, D.C. et Almeida, J.S.** (2001) Objective threshold selection procedure (OTS) for segmentation of scanning laser confocal microscope images. *Journal of Microbiological Methods* 47, 169-180.
- Xavier, K.B. et Bassler, B.L.** (2003b) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology* 6, 191-197.
- Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G. et Lewandowski, Z.** (2001) Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Water Research* 35, 1149-1158.
- Yao, F., Zhou, H. et Lessie, T.G.** (2002) Characterization of *N*-acyl homoserine lactone overproducing mutants of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *FEMS Microbiology Letters* 206, 201-207.

- Yu, V.L. (1993) Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella*? *American Journal of Medicine* 95, 13-15.
- Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L. et Chereshsky, A. (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *Journal of Infectious Diseases* 186, 127-128.
- Zanetti, F., Stampi, S., De Luca, G., Fateh-Moghadam, P., Antonietta, M., Sabbatini, B. et Checchi, L. (2000) Water characteristics associated with the occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units. *European Journal of Oral Sciences* 108, 22-28.
- Zarda, B., Amann, R., Wallner, G. et Schleifer, K.H. (1991) Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides. *Journal of General Microbiology* 137, ( Pt 12) 2823-2830.
- Zhang, H.B., Wang, L.H. et Zhang, L.H. (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4638-4643.
- Zhu, H., Thuruthyil, S.J. et Willcox, M.D. (2001) Production of *N*-acyl homoserine lactones by gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 29, 150-152.
- Zhu, J., Chai, Y., Zhong, Z., Li, S. et Winans, S.C. (2003) *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of *N*-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6949-6953.
- Zhu, J., Beaber, J.W., More, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A. et Winans, S.C. (1998) Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 180, 5398-5405.
- Zink, S.D., Pedersen, L., Cianciotto, N.P. et Abu-Kwaik, Y. (2002) The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infection and Immunity* 70, 1657-1663.
- Zou, C.H., Knirel, Y.A., Helbig, J.H., Zahringer, U. et Mintz, C.S. (1999) Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O acetylation of the O polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 181, 4137-4141.
- Zubkov, M.V. et Sleight, M.A. (1999) Growth of amoebae and flagellates on bacteria deposited on filters. *Microbial Ecology* 37, 107-115.
- Zuckman, D.M., Hung, J.B. et Roy, C.R. (1999) Pore-forming activity is not sufficient for *Legionella pneumophila* phagosome trafficking and intracellular growth. *Molecular Microbiology* 32, 990-1001.
- Zusman, T., Yerushalmi, G. et Segal, G. (2003) Functional similarities between the *icm/dot* pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 71, 3714-3723.

# ANNEXES

## ANNEXE I - MILIEUX DE CULTURE

- **Bouillon Buffered Charcoal Yeast Extract sans charbon actif, composition par litre :**

- extrait de levure (Difco)	10 g
- tampon ACES (Sigma)	10 g
- charbon actif Norit A (Aldrich)	2 g
- alpha cétooglutarate (Sigma)	1 g
- hydroxyde de potassium (Fischer)	2,8 g
- L-cystéine hydrochloride (Sigma)	0,4 g
- pyrophosphate de fer (Sigma)	0,25 g

Tous les éléments sauf la cystéine et le fer sont dissous dans 900 mL d'eau Milli-Q et le pH est ajusté à  $6,9 \pm 0,05$ . Le milieu est ensuite stérilisé par autoclave à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes. Puis le charbon est retiré par filtration à  $0,22 \mu\text{m}$  grâce au système stérifop (Millipore). La cystéine et le fer sont dissous chacun dans 50 mL d'eau Milli-Q et ajoutés stérilement par filtration sur filtre seringue  $0,22 \mu\text{m}$  (Sartorius) à la préparation. Le milieu est conservé à  $+4^\circ\text{C}$ .

- **Milieu R2A, composition par litre :**

- extrait de levure (Difco)	500 mg
- protéose peptone (Difco)	500 mg
- acides casaminés (Difco)	500 mg
- dextrose (Difco)	500 mg
- amidon (Difco)	500 mg
- pyruvate de sodium (Sigma)	300 mg
- sulfate de magnésium (Sigma)	50 mg
- phosphate de potassium di-basique (Sigma)	300 mg
- (+15 g d'agarose (Difco) par L de bouillon pour les géloses)	

Le pH est ajusté à  $7,2 \pm 0,2$  et le milieu est stérilisé par autoclavage à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes. Milieu R2A 10x : composition identique R2A, dans 100 mL

- **Milieu Luriani-Bertani (LB), composition par litre :**

- tryptone (Difco)	10 g
- extrait de levure (Difco)	5 g
- NaCl (Fisher Scientific)	5 g
- NaOH 1N	1 mL
- (+15 g d'agarose (Difco) par L de bouillon pour les géloses)	

Stérilisation par autoclavage à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes.

• **Milieu minimum AT pour les essais de détection avec *Agrobacterium tumefaciens* :**

- Tampon 20 X, composition par litre :
 

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	214 g
---	-------

 pH ajusté à 7 grâce à de la soude
- Sels 20X, composition par litre :
 

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma)	40 g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O (Sigma)	1,6 g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,151 g
Fe SO <sub>4</sub> -7 H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,024 g
- Milieu AT 1X, composition par litre :
 

Tampon 20X	50 mL/L
Sels 20X	50 mL/L
Glucose (Sigma) 50%	10 mL/L
+ /- Bacto-Agar (Difco)	15 g/L

Le tampon et la solution saline sont autoclavés à part. Pour la préparation des géloses, l'agar est dissous dans l'eau millipore et autoclavé. Une fois la température redescendue à 50°C, le X-gal (40 µg/mL), la solution de glucose, les sels et la solution tampon sont ajoutés stérilement par filtration à 0,22 µm.

• **Bouillon TY pour la culture de *C. violaceum*, composition par litre :**

- Tryptone (Sigma) 5 g
- Extrait de levure (Difco) 3 g
- CaCl<sub>2</sub> anhydre (Fisher) 680 mg

• **Bouillon PYG712 pour la culture de *Acanthamoeba castellanii*, composition par litre :**

- Proteose peptone (Difco) 5 g
- Extrait de levure (Difco) 1 g
- Eau millipore 868 mL

Chaque composant préparé et stérilisé séparément est ensuite ajouté directement dans le milieu de base dont la composition est la suivante:

- MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (Sigma) 0,4 M 10 mL
- CaCl<sub>2</sub> (Sigma) 0,05 M 8 mL
- citrate de sodium (Sigma) 0.1M 34 mL
- Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O (Sigma) 0,005 M 10 mL
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (Sigma) 0,25 M 10 mL
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) 0,25 M 10 mL

Le pH est ajusté à 6,9. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 25 min. Après refroidissement du glucose est ajouté par filtration stérilisante :

- glucose (Sigma) 2M 50 mL

• **Milieu de culture AB utilisé pour la croissance de *Vibrio harveyi*, composition par litre :**

- NaCl (Sigma)	17,5 g
- MgSO <sub>4</sub> (Sigma)	12,3 g
- acides casaminés (Difco)	2 g

Le pH est ajusté à 7,5. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 min. Après refroidissement les autres composants sont ajoutés par filtration stérilisante :

- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma) 1M, pH 7	10 mL
- L-arginine (Sigma) 0,1M	10 mL
- glycérol (Sigma) 50%	20 mL

\*\*\*\*

## ANNEXE II - HYBRIDATION *IN SITU* FLUORESCENTE

### Réception et préparation des sondes

Les sondes sont des oligonucléotides d'une longueur variant de 18 à 22 bases, marqués en 5' par un fluorochrome (Cy3 ou Cy5) (Cybergène S.A.). A la réception les sondes lyophilisées sont suspendues dans du TE 1X pH 8,0, afin d'obtenir une concentration de 5 µg/µL. La solution mère est diluée 1/100ème afin d'obtenir la concentration de travail de 50 ng/µL, et aliquotée en tubes de 20 µL pour éviter la décongélation et la recongélation. Les solutions mères peuvent être conservées jusqu'à 2 ans à -20°C et à l'obscurité.

Solution : TE 1X (Tris-EDTA) pH 8,0 :

10 mM Tris HCl (pH 8,0)  
1 mM EDTA (pH 8,0)

Vérification des sondes :

1 à 5 µL de la solution mère de sonde sont dilués dans 500 µL d'eau. L'absorption au spectrophotomètre est mesurée à 260 nm et au maximum d'absorption du fluorochrome (552 nm pour le CY3, 670 nm pour le Cy5). L'absorption du pic de la sonde à 260 nm est divisée par l'absorption du pic du fluorochrome. Un rapport de 2 à 2,5 est correct.

## Préparation des solutions

### - **fixateur à 4% de paraformaldéhyde (PFA)**

1. Chauffer 40 mL d'eau distillée à 60°C
2. Ajouter 2 g de PFA et 150 µL de NaOH 1N (sous la hotte à cause des vapeurs toxiques)
3. Laisser à 60°C sous agitation jusqu'à dissolution complète du PFA (2 min env.)
4. Ajouter 5 mL de PBS 10X
5. Ajuster à pH 8 avec quelques gouttes d'HCl 1N
6. Ajuster à un volume final de 50 mL
7. Filtrer à 0,22 µm pour éliminer les particules

Conserver au maximum 1 semaine à +4°C

### - **Tampon PBS 10X**

Pour 500 mL :	KCl	1,0 g	(2,7 mM)
	NaCl	40,0 g	(138,0 mM)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g	(1,5 mM)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	14,5 g	(20,4 mM)
	Eau distillée qsp	500 mL	

Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH 1N

### - **EDTA 0,5M pH 8,0**

1. Ajouter 186,1 g de di-sodium EDTA.2H<sub>2</sub>O à 800 mL d'H<sub>2</sub>O
2. Agiter vigoureusement avec un agitateur magnétique
3. Ajuster à pH 8,0 avec environ 20 g de pastilles de NaOH
4. Aliquoter et stériliser par autoclavage

### - **Tris-HCl 1M pH 8,0**

1. Dissoudre 121,1 g de Tris-base dans 800 mL d'eau MilliQ
2. Ajuster à pH 8,0 avec de l'HCl concentré (10N)
3. Laisser la solution refroidir à t° ambiante avant de faire l'ajustement final
4. Compléter à 1 L avec de l'eau MilliQ, aliquoter et stériliser par autoclavage.

### - **Tampons d'hybridation et de lavage**

La stringence du tampon d'hybridation est ajustée en faisant varier les quantités de formamide. Celle du tampon de lavage est ajustée en faisant varier la quantité de NaCl 5M, donc la force ionique du tampon. A une solution d'hybridation de stringence donnée correspond une solution de lavage de stringence plus élevée.



## 1. Solution d'hybridation

Pour 1 mL :	20 $\mu$ L de Tris-HCl 1M pH 8	(20 mM)
	180 $\mu$ L de NaCl 5M	(0,9 M)
	X $\mu$ L de formamide (X/10 = pourcentage final)	
	800-X $\mu$ L d'eau millipore	
	1 $\mu$ L de SDS 10% (à ajouter en dernier)	(0,01%)

## 2. Solution de lavage

Pour 50 mL :	1 mL de Tris-HCl 1 M pH 8	(20 mM)
	500 $\mu$ L d'EDTA 0,5 M (seulement si le formamide est supérieur ou égal à 20% dans le tampon d'hybridation)	(5 mM)
	Y $\mu$ L de NaCl 5M	
	Compléter à 50 mL avec de l'eau millipore	
	50 $\mu$ L de SDS 10%	(0,01%)

Valeurs de Y :

% formamide tampon d'hybridation (en $\mu$ L)	NaCl 5M à ajouter pour 50 mL (en $\mu$ L)
---	---

0	9000
5	6300
10	4500
15	3180
20	2150
25	1490
30	1020
35	700
40	460
45	300
50	180
55	100

**Hybridation****- Décrochage des bactéries de la membrane**

Les membranes sur lesquelles les bactéries fixées sont déposées sont grattées à l'aide de râpeaux à cellules stériles. Les 5 mL de suspension sont prélevés et les cellules sont lavées : centrifugation 5 min à 5 000 g et reprise du culot dans 5 mL d'une solution neuve d'éthanol / PBS 1:1 (v/v) filtrée à 0,22  $\mu$ m (EtOH/PBS), vortex 30 secondes, nouvelle centrifugation, reprise dans 3 à 5 mL d'EtOH/PBS et sonication pendant 3 minutes.

**- Dépôt sur lame, perméabilisation et déshydratation**

50  $\mu$ L de la suspension cellulaire sont prélevés et déposés dans un puits sur une lame téflon à revêtement de polylysine (Merck). La lame est mise à sécher à

l'étuve à 37°C. Les puits destinés à être traités au lysozyme sont d'abord lavés par dépôt de 50 µL d'une solution de Tris-EDTA (8 mL d'eau, 1 mL de Tris-HCl 1M pH 8 et 1 mL d'EDTA 0,5 M) pendant 3 min. La solution est ensuite remplacée par la même solution contenant la concentration voulue de lysozyme : 1 ou 10 mg/mL, l'incubation dure 10 ou 30 min à t° ambiante. La lame est ensuite rincée par immersion pendant 3 min dans 50 mL de la solution de Tris-EDTA. Les cellules sont ensuite déshydratées par immersions successives de la lame pendant 3 min dans des solutions d'éthanol de concentrations 50, 80 et 96%.

#### - **Hybridation et lavage**

10 µL de tampon d'hybridation sont déposés sur le puits, puis 1 µL de solution de sonde à 50 ng/µL est ajouté. La lame est introduite dans une chambre d'hybridation (tube 50 mL contenant un papier imbibé de tampon d'hybridation) et placée à 46°C pendant 90 min. Passée cette durée la lame est immergée dans 50 mL de tampon de lavage préalablement chauffé à 48°C, et incubée pendant 10 min à cette même température. La lame est ensuite rincée quelques secondes dans de l'eau MilliQ glacée, puis séchée à l'air comprimé.

#### - **Contre-marquage et montage**

Afin de visualiser la biomasse en microscopie à fluorescence un contre-marquage des lames au syto-9 est réalisé. Ce réactif fait partie du kit *BacLight*<sup>®</sup> LIVE/DEAD (Molecular Probes, L-13512), c'est un intercalant de l'ADN qui pénètre dans toutes les cellules. Le contenu d'une pipette de réactif est repris dans 35 mL d'eau MilliQ glacée. La lame est immergée 3 minutes sur glace et à l'obscurité dans cette solution, lavée par immersion quelques secondes dans de l'eau MilliQ glacée et de nouveau séchée à l'air comprimé. Enfin, la lame est montée avec le réactif *SlowFade*<sup>®</sup> Antifade (Molecular Probes) et conservée à +4°C et à l'obscurité jusqu'à l'observation microscopique qui est réalisée dans les 24 heures.

\*\*\*\*

## **ANNEXE III - METHODES D'ISOLEMENT ET DE CULTURE**

### • **Résumé de la méthode d'isolement des légionelles (AFNOR T90-431)**

Chaque prélèvement d'un litre d'eau est acheminé au laboratoire dans un délai de 48 heures maximum. L'échantillon est filtré sur une membrane en polycarbonate de porosité 0,22 µm (Millipore, GTTP04700), le filtre est repris dans 10 mL de l'échantillon initial et les bactéries sont décrochées par sonication pendant 3 minutes. La suspension subit une décontamination sélective par traitement acide

avec un tampon KCl-HCl pH=2 ou par chauffage à  $50\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes. Des ensemencements sont réalisés sur gélose GVPC et incubés à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 10 jours (dénombrements réalisés à 3, 5 et 10 jours). Les colonies caractéristiques sont repiquées sur géloses BCYE, UNBCYE avec incubation à  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 10 jours. *L. pneumophila* se développe sur BCYE, pas sur UNBCYE tandis que la plupart des autres espèces de légionelles se développent sur les deux types de géloses.

- **Méthode de recherche et de dénombrement des amibes**

- Préparation de la gélose NNA :
  - une souche d'*E. coli* (CIP 106876) est ensemencée sur gélose cœur-cervelle (ref 64174 Biorad) et incubée 72 h à  $37^\circ\text{C}$
  - les colonies sont raclées et étalées sur gélose NNA, dont la composition par L est la suivante :

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,662 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,400 g
MgSO <sub>4</sub>	0,062 g
Agar	15 g
pH	7

- Ensemencement :
  - les échantillons à analyser sont filtrés sur membrane acétate de cellulose de porosité 0,8  $\mu\text{m}$ , la membrane est coupée en deux et la face sur laquelle le filtrat a été recueilli est appliquée sur la gélose NNA
  - les géloses sont incubées 3 à 15 jours à  $30^\circ\text{C}$
- Lecture :
  - un résultat positif sur gélose se caractérise par l'apparition d'une plage de lyse due à la consommation du tapis bactérien
  - une plage au moins doit être observée et la présence d'amibes doit être confirmée par observation de kystes ou de trophozoïtes en microscopie
  - chaque volume testé est réalisé 3 ou 5 fois en fonction des tables d'interprétation NPP utilisées, le nombre d'amibes doit être multiplié par 2 pour prendre en compte les pertes lors de l'étape de filtration.

## - Tables NPP :

Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			NPP dans 100 mL	Limite de confiance à 95 %	
3 tubes de 10 mL	3 tubes de 1 mL	3 tubes de 0,1 mL		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			NPP dans 100 mL	Limite de confiance à 95 %	
5 tubes de 10 mL	5 tubes de 1 mL	5 tubes de 0,1 mL		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	2	< 0,5	7
0	1	0	2	< 0,5	7
0	2	0	4	< 0,5	11
1	0	0	2	< 0,5	7
1	0	1	4	< 0,5	11
1	1	0	4	< 0,5	11
1	1	1	6	< 0,5	15
1	2	0	6	< 0,5	15
2	0	0	5	< 0,5	13
2	0	1	7	1	17
2	1	0	7	1	17
2	1	1	9	2	21
2	2	0	9	2	21
2	3	0	12	3	28
3	0	0	8	1	19
3	0	1	11	2	25
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	2	0	14	4	34

## - Tables NPP suite

Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			NPP dans 100 mL	Limite de confiance à 95 %	
5 tubes de 10 mL	5 tubes de 1 mL	5 tubes de 0,1 mL		Limite inférieure	Limite supérieure
3	2	1	<b>17</b>	5	46
3	3	0	<b>17</b>	5	46
4	0	0	<b>13</b>	3	31
4	0	1	<b>17</b>	5	46
4	1	0	<b>17</b>	5	46
4	1	1	<b>21</b>	7	63
4	1	2	<b>26</b>	9	78
4	2	0	<b>22</b>	7	67
4	2	1	<b>26</b>	9	78
4	3	0	<b>27</b>	9	80
4	3	1	<b>33</b>	11	93
4	4	0	<b>34</b>	12	96
5	0	0	<b>23</b>	7	70
5	0	1	<b>31</b>	11	89
5	0	2	<b>43</b>	15	114
5	1	0	<b>33</b>	11	93
5	1	1	<b>46</b>	16	120
5	1	2	<b>63</b>	21	154
5	2	0	<b>49</b>	17	126
5	2	1	<b>70</b>	23	168
5	2	2	<b>94</b>	28	219
5	3	0	<b>79</b>	25	187
5	3	1	<b>109</b>	31	253
5	3	2	<b>141</b>	37	343
5	3	3	<b>175</b>	44	503
5	4	0	<b>130</b>	35	302
5	4	1	<b>172</b>	43	486
5	4	2	<b>221</b>	57	698
5	4	3	<b>278</b>	90	849
5	4	4	<b>345</b>	117	999
5	5	0	<b>240</b>	66	754
5	5	1	<b>348</b>	118	1005
5	5	2	<b>542</b>	180	1405
5	5	3	<b>918</b>	303	32222
5	5	4	<b>1609</b>	635	5805

## ANNEXE IV – ALIGNEMENTS DE PROTEINES INTERVENANT DANS LE QUORUM SENSING CHEZ DIFFERENTES ESPECES BACTERIENNES AVEC LE GENOME DE *L. pneumophila*

Alignements "tblastN", réalisés début février 2004 sur le site :  
<http://genome3.cpmc.columbia.edu/~legion/index.html>

Sequences producing significant alignments: Value N	Score (bits)	E
--	-----------------	---

**Query=** HdtS synthèse AI-1, *Pseudomonas fluorescens*, AAG30826, (Laue et al. 2000), (259 letters)

CTG.LP.BC.5H86D8.1701.030499 [36](#) 9e-06 2

**Query=** LuxQ sensor AI-2, *Vibrio harveyi*, AAA20838, (Bassler et al. 1994a), (859 letters)

CTG.BC.5E96F9.16.11.050400 [133](#) 3e-47 4  
CTG.LP.WG.28.04-R.101599 [64](#) 9e-11 2

**Query=** LuxN sensor AI-1, *Vibrio harveyi*, P54301, (Bassler et al. 1993), (849 letters)

CTG.BC.5E96F9.16.11.050400 [57](#) 1e-19 5

**Query=** LuxU AI-1 & 2 repressor protein, *Vibrio harveyi*, AAD12736, (Freeman et al. 1999), (453 letters)

CTG.LP.WG.28.04-R.101599 [242](#) 9e-82 2  
CTG.BC.5E96F9.16.11.050400 [239](#) 8e-81 2

**Query=** LuxO regulator AI-1 & 2, *Vibrio harveyi*, P54299, (Bassler et al. 1994b), (453 letters)

CTG.LP.WG.28.04-R.101599 [242](#) 9e-82 2  
CTG.BC.5E96F9.16.11.050400 [239](#) 8e-81 2

**Query=** response regulator LuxR family, *Streptomyces coelicolor*, CAB89747, (Bentley et al. 2002), (230 letters)

CTG.LP.WG.28.04-R.101599 [91](#) 5e-36 2  
CTG.BC.5E96F9.16.11.050400 [105](#) 5e-31 4

**Query=** transcriptional regulator LuxR family, *Vibrio cholerae*, NP 230858, (Heidelberg *et al.* 2000), (214 letters)

CTG.BC.5E96F9.16.11.050400	<a href="#">269</a>	4e-73	1
CTG.LP.WG.28.04-R.101599	<a href="#">43</a>	1e-05	2

**Query=** transcriptional regulator LuxR family, *Neisseria meningitidis*, NP 274273, (Tettelin *et al.* 2000), (218 letters)

CTG.BC.5E96F9.16.11.050400	<a href="#">107</a>	2e-24	2
----------------------------	---------------------	-------	---

**Query=** DNA-binding response regulator LuxR family, *Brucella suis*, NP 697374, (Paulsen *et al.* 2002), (213 letters)

CTG.BC.5E96F9.16.11.050400	<a href="#">99</a>	4e-26	2
CTG.LP.WG.28.04-R.101599	<a href="#">51</a>	2e-07	1

**Query=** response regulator LuxR family, *Shewanella oneidensis*, NP 718125, (Heidelberg *et al.* 2002), (658 letters)

CTG.BC.5E96F9.16.11.050400	<a href="#">236</a>	1e-73	3
CTG.LP.WG.28.04-R.101599	<a href="#">242</a>	1e-64	3
CTG.LP.WG.098.22.020100	<a href="#">209</a>	1e-54	1
CTG.1B121E7.007.43R.100799	<a href="#">119</a>	1e-52	2

\*\*\*\*

## ANNEXE V – PUBLICATIONS

## • Publication 1

ORIGINAL ARTICLE

Taylor & Francis  
healthsciencesMolecular Characterization and Spatial Analysis of a Simplified Gut Microbiota Displaying Colonization Resistance against *Clostridium difficile*Vincent Thomas<sup>1</sup>, Violaine Rochet<sup>2</sup>, Helene Boureau<sup>1</sup>, Caroline Ekstrand<sup>1</sup>, Stéphane Bulteau<sup>1</sup>, Joël Doré<sup>2</sup>, Anne Collignon<sup>1</sup> and Pierre Bourlioux<sup>1</sup>From the <sup>1</sup>Département de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France and <sup>2</sup>Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, I.N.R.A. Centre de Recherches de Jouy-en-Josas, 78352 Cedex, France

Correspondence to: Anne Collignon, Département de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France. Tel.: + 33 1 468 35529/49; Fax: + 33 1 468 35537; E-mail: anne.collignon@cep.u-psud.fr

Microbial Ecology in Health and Disease 2002; 14: 203–210

The gut microbiota naturally protects the host against infections by pathogens. This microbiota can be disrupted in case of antibiotic treatments leading to the loss of the barrier effect and consequently to new colonization and opportunistic infections. We previously developed in our laboratory a trixenic mouse model microbiota displaying colonization resistance against *Clostridium difficile*. In this study, we used whole cell fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes in order to better evaluate the composition of this barrier flora and the spatial localization of each species. Flow cytometry technique in combination with FISH permitted to accurately quantify each species confirming the major contribution of a new species we named *Clostridium "fusiformis"*. Transmission electron microscopy (TEM) and FISH combined with image analysis on tissue sections permitted to show that the previously unidentified species conferring the barrier effect is flagellated and deeply implanted in the crypts. **Key words:** simplified gut microbiota, mouse model, *Clostridium difficile*, rRNA probes, fluorescence *in situ* hybridization, flow cytometry.

## INTRODUCTION

The human host and its intestinal microbiota constitute a complex ecosystem the equilibrium of which serves as a remarkable example of reciprocal adaptation. There are more than 400 bacterial species in the human colonic microbiota and 30–40 bacterial species constitute 99% of the cultivable faecal microflora of each single individual. However, numerous bacterial types cannot be cultured and remain unknown (1–3). The applicability of new techniques to directly study the various components of this microbiota can overcome the need of cultivation (4). It should thereby enhance our knowledge of this complex microbial community (5, 6).

We still know very little about the mechanisms that control the nature of this intestinal microbiota i.e. which bacteria will colonize certain areas of the gastrointestinal tract and which bacteria will be excluded. Furthermore, we do not know how indigenous microorganisms establish and maintain stable niches in their mammalian host, creating truly symbiotic relationships (7). The presence of this indigenous microbiota is one of the major defence mechanisms that protects the human or animal intestine against colonization by allochthonous invading bacteria; this func-

tion is called the barrier effect or colonization resistance (8).

The development of gnotobiotic models allows a better understanding of the interactions between the microbiota and its host, between autochthonous bacteria and allochthonous pathogenic bacteria. Our laboratory has previously developed a model in gnotobiotic mice representing a simplified gut microbiota capable of inhibiting the implantation of *Clostridium difficile* (9). *C. difficile* is responsible for a spectrum of diseases ranging from mild diarrhoea to pseudomembranous colitis after disruption of the normal flora by antibiotic treatment and consequent loss of colonization resistance. We have previously shown that this simplified flora is composed of three different morphotypes: large gram-positive rods identified by biochemical characteristics as *Clostridium indolis*, spiral gram-positive bacteria identified as *Clostridium cocleatum*, and fusiform gram-positive bacteria not yet identified, named up until now *Eubacterium* spp. (10, 11). This third strain is necessary for the barrier effect and its implantation is dependent on the previous implantation of *C. indolis* and *C. cocleatum*. In our gnotobiotic model, we have shown that it is necessary to perform sequential implantation: first *C. in-*



*dolis*, second *C. coeleatum* and third the fusiform bacteria. The culture of these fusiform bacteria is very difficult and requires extremely strict anaerobic conditions.

The aim of the present study was the molecular analysis of this barrier microbiota capable of inhibiting the implantation of *C. difficile*. The work presented here focused on: (i) the identification of this barrier flora by 16S rDNA sequencing; (ii) the relative quantification and spatial localization of this flora by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental animals

All animals used in this study were gnotoxenic C3H mice (male, 1–2 months old) bred in sterile isolators. Dixenic mice were sequentially implanted with *C. indolis* and *C. coeleatum*, trixenic mice with *C. indolis*, *C. coeleatum* and *Eubacterium* spp.

### Culture methods

*C. coeleatum*, *C. indolis* and *Eubacterium* spp. strains have been isolated from mice by culturing the caecal suspension in an anaerobic chamber in an atmosphere of 85% nitrogen, 10% hydrogen and 5% carbon dioxide. Media used were previously described (11).

### 16S rDNA sequencing and probe design

16S rDNA of the different species composing the barrier flora were amplified by PCR using universal primers as previously described (12). For each isolate, cells were picked from a single colony and directly added to 100  $\mu$ l of PCR-mix (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 pmol of each primer, 200 mM of each dNTP (Promega), 0.5 U of Taq polymerase (Promega), 10  $\mu$ l of 10  $\times$  Taq polymerase buffer in ultra-pure water). Amplification was carried out in a Thermal Cycler 480 (Perkin–Elmer) with initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by subsequent amplification for 34 cycles with each cycle consisting of a denaturation step at 95°C for 1 min, an annealing step at 55°C for 1 min, an extension at 72°C for 2 min (+ 5 s per cycle) and with a final extension for 10 min at 72°C. The amplicons were purified by using QIAquick spin columns (Qiagen) and analyzed by gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Sequences were determined by using an automatic sequencer (ABI Prism 310, Perkin–Elmer) and the Big-Dye Terminator kit (Perkin–Elmer), by using universal primers used for amplification as well as internal primers. The sequences obtained were aligned with other *Clostridia* 16S rRNA gene sequences using the on-line software MULTALIN (13) [<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>].

Specific target-segments of the 16S rRNA were identified for each bacterial species and submitted to the 'Check Probe' on-line program on the Ribosomal Data-

base Project site ((14) [<http://www.cme.msu.edu/RDP/>]) in order to test their specificity. The following specific probes were selected: 5'-CCATCCGAAAACTTCCTTCC-3' for *C. indolis*, 5'-ATGTCATTTCTCCATCCG-3' for *C. coeleatum* and 5'-CGGTAAAGTCCCGGCAC-3' for *Eubacterium* spp. We also used the domain probe *Eubacteria* 338 (Eub 338) and the nonsense corresponding probe Non *Eubacteria* (Non Eub) (15). HPLC-purified probes were purchased from Cybergène S.A., France. Probes were 5' labeled with sulfo-tris-indocyanine fluorochrome (CY3) for observation by epifluorescence microscopy (EFM), or fluorescein isothiocyanate (FITC) for flow cytometry (FCM). The lyophilized probes were diluted in distilled water pH 7 (CY3-labelled probes) or carbonate buffer 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9 (FITC-labelled probes) to obtain a 5  $\mu$ g/ml concentration, and then diluted 100-fold to 50 ng/ml final working concentration.

### Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on pure cultures

Twenty-four hour bacterial cultures were harvested and diluted in 0.1 M PBS pH 7.2 to obtain 10<sup>9</sup> cells per ml. One volume of this suspension was diluted in 3 volumes of paraformaldehyde 4% (PFA) for fixation at 4°C for 3 h. After centrifugation the pellet was washed three times with PBS pH 7.2 and stored in ethanol/PBS (1/1, v/v) at –20°C for 1 month maximum before use. Five hundred  $\mu$ l of the fixed sample were centrifuged; the pellet was washed in 100 mM Tris–HCl pH 8, 50 mM EDTA and resuspended cells were treated with 10 mg/ml lysozyme (Sigma) in the same buffer for 10 min at room temperature. After three washings with PBS the pellet was resuspended in 1 ml PBS pH 7.2 and an aliquot of 20  $\mu$ l was centrifuged. The pellet was washed in 20  $\mu$ l of hybridization buffer (20% formamide, 0.9 M NaCl, 20 mM Tris–HCl pH 8, 0.01% sodium dodecyl sulfate). For 20  $\mu$ l of hybridization buffer, 3  $\mu$ l of probe solution (CY3 or FITC-labelled) at 50 ng/ml were added and samples were incubated 4 h at 46°C in darkness. After hybridization, samples were washed in washing buffer 0.45 M NaCl, 0.01%, sodium dodecyl sulfate, 5 mM EDTA, 20 mM Tris–HCl pH 8 at 48°C and left in the same prewarmed buffer for 10 min. The pellet was resuspended in 20  $\mu$ l of PBS pH 8 filtered twice through a 0.22  $\mu$ m filter (Millipore).

For observation in EFM (CY3-labelled probes), 5  $\mu$ l of each sample were loaded on well slides (Fischer Scientific) and dried at 37°C. They were then dehydrated by sequential washes in 50, 80, and 98% ethanol. The slides were mounted with a SlowFade antifade kit (Molecular Probes) completed with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) in 0.0001% (w/v) solution. The observation with epifluorescence microscope (Aristoplan, Leitz) was performed using excitation wavelength at 570 nm for CY3-labelled probes and 447 nm for DAPI. Each probe was tested with each strain of the barrier flora to assess its specificity.

For FCM (FITC-labeled probes), the hybridized samples were kept overnight at +4°C in darkness before analysis. Fifteen  $\mu$ l of each sample was then diluted in 1 ml of  $2 \times 0.22$  mm filtered PBS pH 8 in a polystyrene tube for FCM (Becton Dickinson Labware). The remaining 5  $\mu$ l were applied on slides and treated as described above for EFM observation. Analysis was carried out first with the Non Eub hybridized sample without propidium iodide (PI, Molecular Probes), then with PI (100 ng of PI in each sample, 10 min before analysis). The samples were vortexed and passed at low speed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Analysis was done using CELL QUEST software (Becton Dickinson). FITC fluorescence was detected in the FL1-channel, PI fluorescence in the FL3-channel. One gate was used in the FL3 channel to count only the PI-positive events and to subtract the background fluorescence of the cells hybridized with the Non Eub negative control. Another gate in the SSC channel permitted to exclude most of the small fragments. Thirty thousand events were counted at approximately 500 events per s.

#### *FISH on faeces*

*In situ* hybridization was applied to faeces issued from six mice. Faeces were weighed, diluted 1/10 (w/v) in sterile PBS buffer pH 7.2 and vortexed for 20 s at 2500 rpm. After 10 min, the supernatant was diluted in 3 volumes of 4% PFA for fixation at 4°C for 3 h. The same procedure as described above was used for hybridization, except that hybridization was conducted with CY3-labelled probes only.

#### *FISH on caecal contents*

*In situ* hybridization of caecal contents was performed on contents issued from six mice. Open caeca were cut longitudinally and gently scraped. The same procedure as described above for hybridization on faecal suspensions was employed, and hybridization was carried out with CY3- and FITC-labeled probes. Three independent analyses were run for each of the six caeca.

#### *FISH on caecal sections*

Six open caeca were cut longitudinally and gently rinsed with PBS buffer to maintain the mucus layer *in situ*. Out of the center of the tissue, a square of approximately 15 mm<sup>2</sup> was excised out and dipped into a freezing liquid (Cryomatrix, Shandon; Life Sciences International Ltd.), and then frozen by immersion in liquid nitrogen. Samples were kept at -80°C until hybridization. Five to 10  $\mu$ m thick sections were cut in a cryostat (Cryomine, Osi, France) and mounted onto polylysine slides (Poly-prep slides, Sigma), fixed in 4% PFA for 30 min at room temperature, rinsed twice in PBS pH 7.2 and once in distilled water, then allowed to dry. With a pap pen (Sigma), a circle was drawn around the tissue specimen. Sections were then

covered with 50  $\mu$ l hybridization solution i.e. 44  $\mu$ l hybridization buffer with 30% formamide and 6  $\mu$ l CY3-labelled probe at 50 ng/ml (6 ng/ml final concentration). Wells were subsequently covered with incubation chambers (Probe-clip press-seal incubation chambers, Sigma) and the slides were incubated in darkness at 46°C for 16 h. After hybridization, wells were washed with 50  $\mu$ l pre-warmed hybridization buffer at 46°C for 20 min in darkness. The slides were then rinsed with distilled water and allowed to dry at 37°C in darkness. The slides were finally mounted in a Slow Fade<sup>®</sup> solution containing 0.0001% DAPI and observed in the same way as previously described.

#### *Electron microscopy*

Bacteria were cultivated on blood agar or TGY broth for 2–3 days. One colony or one drop of bacterial suspension was diluted in sterile PBS pH 7.2. One drop of this suspension was deposited on parafilm. Bacteria were then adsorbed by placing carbon stabilized nitro-cellulose film copper specimen grids (Fullman Inc., USA) on the drop for 5 min. The grid was negatively stained with a 2% phosphotungstic acid solution, pH 7.2, for 2 min. After removing of the excess of staining solution and drying, the grids were observed by using a 301 Philips transmission electron microscope.

For *in vivo* localization of bacteria, open caeca of axenic and gnotoxenic mice were cut longitudinally and gently rinsed with PBS buffer. Out of the center, squares of approximately 15 mm<sup>2</sup> were excised. Tissue samples were then fixed in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4 plus 1.5% glutaraldehyde (Sigma) for 20 min at room temperature. Samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 20 min at room temperature, dehydrated in a series of graded ethanol solutions and embedded in Epon resin. Ninety nm sections were cut with a Leica Ultracut microtome, placed on grids, stained for 20 min with uranyl acetate and 10 min with lead citrate. Grids were observed with a 301 Philips transmission electron microscope.

#### *Nucleotide sequences accession numbers*

The 16S rDNA gene sequences of strains studied here have been deposited in the EMBL data library under accession no. AF028349 to AF028351.

## RESULTS

#### *Molecular identification of the barrier flora against C. difficile*

16S rDNA sequencing confirmed the identity of the two previously described anaerobic species *C. indolis* and *C. cocleatum* (10, 11) as their sequences were present in the ribosomal data base. The third strain, *Eubacterium* spp., was not referenced in the ribosomal database and we

named it *Clostridium "fusiformis"*, due to its spindle shape. A formal description of the species is currently under way. We constructed a phylogenetic tree (Fig. 1), indicating that this species is located in the clostridial cluster XIVa (16). It is extremely oxygen sensitive and spore forming. TEM in pure culture and *in vivo* permitted to show that only *C. fusiformis* was flagellated (data not shown).

#### Validation of specific probes

For each barrier strain, short sequences were chosen after alignment with phylogenetically close species and submitted to the 'Check Probe' program of the RDP, revealing that each probe was theoretically specific for the targeted organism. Each specific probe was validated using pure cultures of the different species in order to verify that (i) the targeted rRNA in whole cells was accessible; (ii) that the signal intensity was sufficient; and (iii) that each probe hybridized only with the targeted strain. The three bacterial species were hybridized with CY3-labelled probes for detection by EFM, with FITC-labelled probes for detection by FCM. As observed by EFM and FCM, bacteria were labeled by the universal probe Eub 338 and the specific probes, whereas no fluorescence occurred after hybridization with the Non Eub probe. No cross-reaction occurred between the three probes.

#### Relative quantification of the barrier flora in faeces and caeca of trixenic mice

In faeces of trixenic mice, after hybridization with specific probes and detection by EFM, we were able to detect *C. cocleatum* and *C. fusiformis*, but not *C. indolis*. Nevertheless, bacteria presenting the same typical morphology as *C. indolis* were detected by DAPI-staining, suggesting that *C. indolis* was present. For the other two species, the compari-

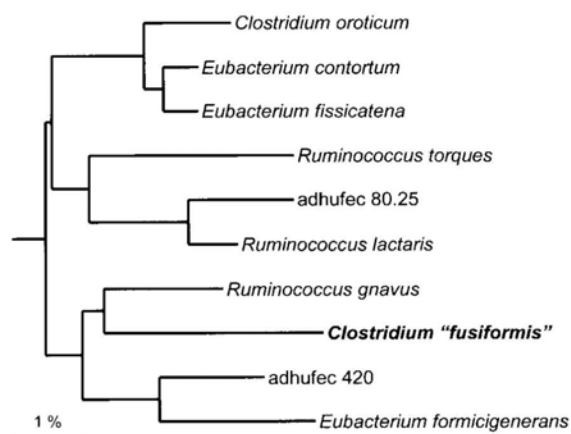


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the 16S DNA sequences, showing the position of *C. fusiformis* in the clostridial cluster XIVa. The tree was constructed by neighbor-joining analysis of distance matrix obtained from a multiple-sequence alignment. The scale bar represents substitutions per 100 nucleotides.

son by EFM of specific probe- and DAPI-labeled fields permitted to show that most of the cells presenting typical *C. cocleatum* or *C. fusiformis* morphology were labeled. In caecal contents, the three species were easily detected, and probe conferred fluorescence of *C. fusiformis* was more intense than in faecal suspensions; therefore we decided to continue our experiments on caecal contents only.

After validation of hybridization with CY3-labelled probes, we used FITC-labelled probes for enumeration by FCM. We tested different concentrations of PI in order to label the DNA-containing cells and to allow simultaneous detection of the FITC-conferred fluorescence. High concentrations ( $> 30 \mu\text{g/ml}$ ) of PI completely overlapped the FITC-fluorescence. A 100 ng/ml concentration was found to be appropriate: PI- and FITC-positive events were clearly distinguishable from the background noise. Furthermore, we excluded the events for which SSC-value was inferior to 256, since these events corresponded only to fragments. Among PI-positive events  $71.6 \pm 2.4\%$  were detected by the Eub 338 probe. Results of the relative quantification of each species are reported in Fig. 2 (Fig. 2 Left) Among the Eubacteria detected events,  $3.3 \pm 1.1\%$  were detected by the *C. indolis* specific probe,  $10.3 \pm 2.6\%$  by the *C. cocleatum* specific probe and  $78.2 \pm 5.2\%$  by the *C. fusiformis* specific probe.

#### Spatial localization of the barrier flora species

Hybridization with the three species-specific labeled probes permitted to localize the bacteria in caecal tissue sections of trixenic mice. *C. indolis* and *C. cocleatum* were observed adhering to the mucus layer and were present near the surface of microvilli (Fig. 2, D and H). *C. fusiformis* was localized inside the mucus layer, near the surface of the villi, and at the opening and within the crypts (Fig. 2, F). TEM confirmed the results obtained by *in situ* hybridization. No bacteria were detected inside the crypts in dixenic mice (*C. indolis* + *C. cocleatum* harboring mice) (data not shown). In contrast, we observed bacteria deep inside the crypts and in direct contact with microvilli in trixenic caeca (Fig. 3). Flagellar structures were present around these bacteria, strongly suggesting the presence of *C. fusiformis*.

#### DISCUSSION

In order to identify the bacterial species involved in our model barrier flora, we sequenced the 16S rDNA of the three species and compared it with sequences in the Ribosomal Database. This allowed us to confirm the identity of two species as *C. indolis* and *C. cocleatum* and to determine the phylogenetic position of the third strain in the clostridial cluster XIVa (16). To explain the barrier effect, we focused on the interactions taking place in the caecal mucus layer between host cells and the barrier microbiota. By scanning electron microscopy and the 'Swiss rolls'

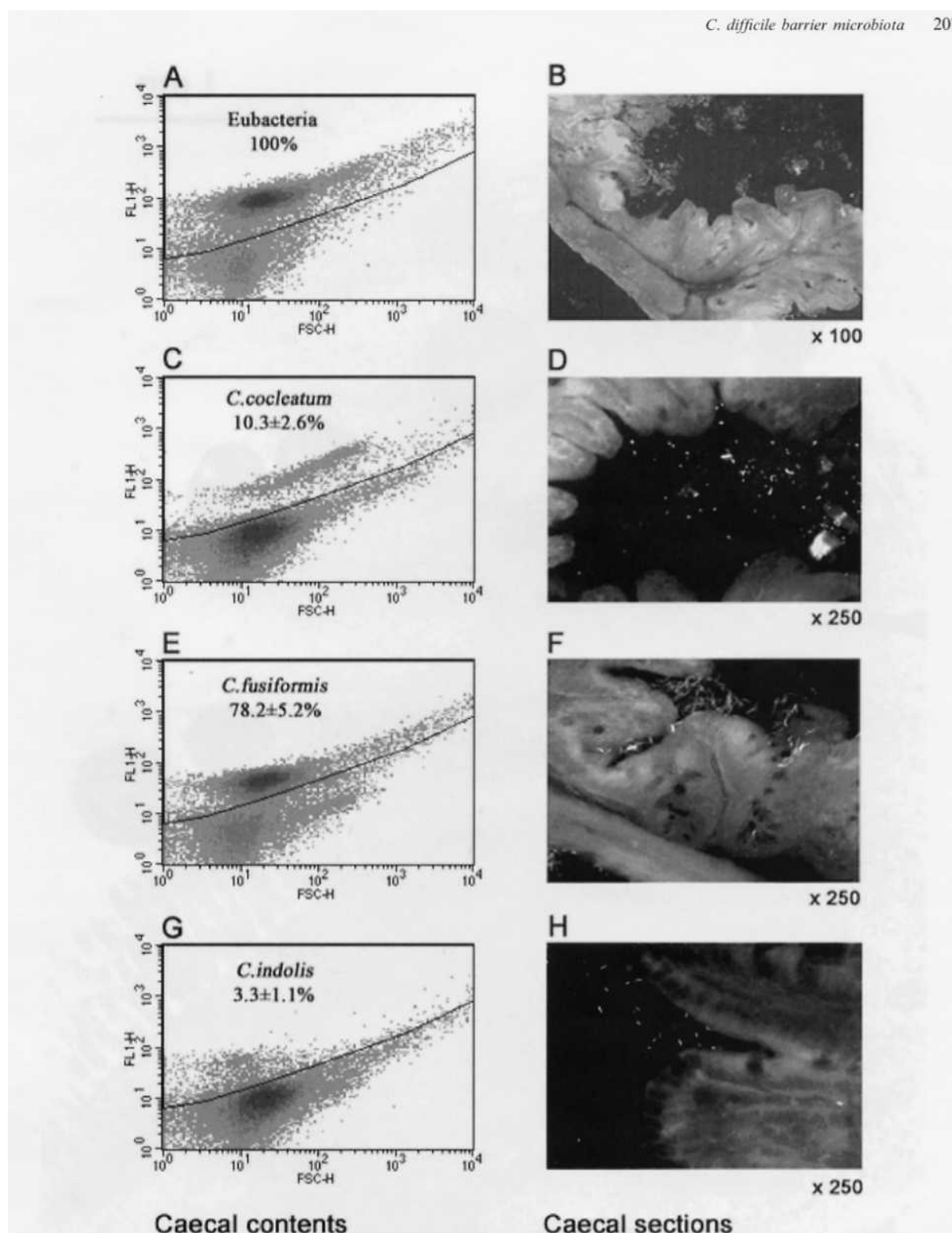
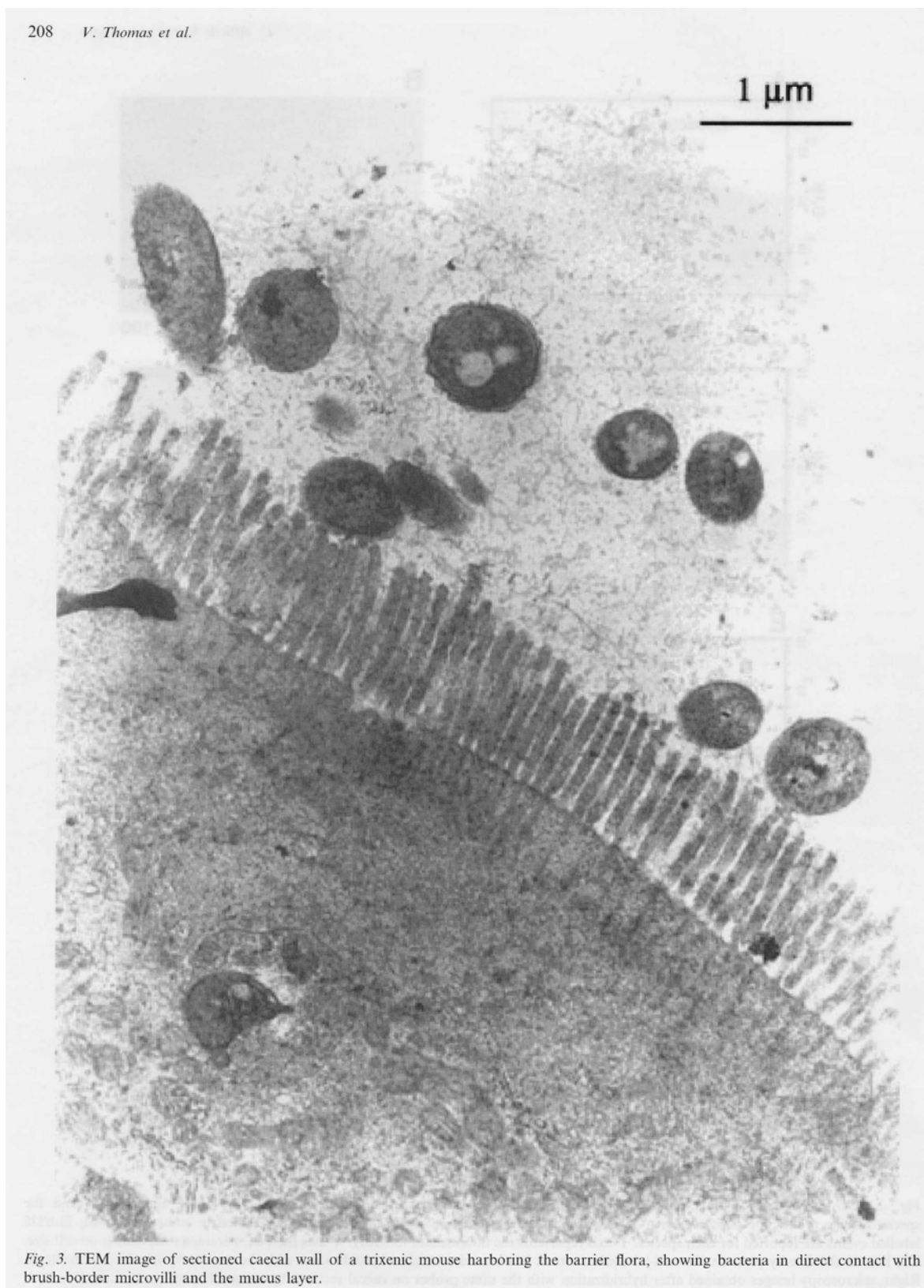


Fig. 2. Left: FCM density plots obtained after hybridization of caecal contents with the universal probe Eub338 (A) and the species-specific probes for *C. cocleatum* (C), *C. fusiformis* (E) and *C. indolis* (G). Percentages calculated in comparison with Eub338 labelled events are reported for each species. Y-axis represents the fluorescence intensity, X-axis the FSC parameter depending on cell size. The line on the density plots fix the non-labelled events: it has been drawn after hybridization with the negative probe Non Eubacteria. Right: microscopy images obtained after hybridization with the same probes on caecal sections by using EFM (B probe Eub 338, D, F and H species-specific probes for *C. cocleatum*, *C. fusiformis* and *C. indolis*, respectively).



*Fig. 3.* TEM image of sectioned caecal wall of a trixenic mouse harboring the barrier flora, showing bacteria in direct contact with brush-border microvilli and the mucus layer.



technique, we previously observed that the three barrier species and *C. difficile* were embedded in the mucus layer (17) and furthermore that the barrier strains were capable of degrading mucins, contrary to *C. difficile* (11). In order to better appreciate the constitution and the spatial distribution of the *C. difficile* model barrier flora we used in this work the rRNA probe technology. This technology has been used to study a variety of ecosystems, and there are several examples of its application for the *in situ* study of gut flora on histological sections (18–20). In our study, only  $71.6 \pm 2.4\%$  of the PI positive events were detected with the Eub338 probe. This result is not surprising: the PI-positive but Eub338-negative events are certainly bacteria with low metabolic activity and hence low rRNA contents, that cannot be detected by hybridization with rRNA-targeted probes (3, 21). The relative quantification of the barrier flora by FCM showed that *C. fusiformis* is widely predominant in the barrier flora (78.2%), followed by *C. cocleatum* (10.3%) and *C. indolis* (3.3%). The fact that *C. indolis* is the least abundant species in caecal content could in part explain the fact that we could not detect it in the faeces by EFM. Moreover, *C. indolis* may exhibit a poor metabolic activity. We previously demonstrated that this species possesses only a sialidase activity, whereas *C. cocleatum* possesses a wide-ranging enzymatic potential that may confer it an elevated metabolic activity in the faeces (17). The use of FCM to detect hybridized bacteria proved to be a powerful tool for quantification of species in the gut: this material allowed to count much more individual bacterial cells than visual counting with EFM (22, 23). Because proportions of each species are not necessary the same in the lumen and in the crypts, a promising tool for intestinal ecology studies would be FCM counting after separation of the flora into lumen-, mucus- and epithelium-associated subpopulations (24).

Three distinct mechanisms allow bacteria to escape from intestinal transit, and to persist in the gut: adhesion, surface and deep mucus colonization and crypt association (19). Our data suggest that *C. fusiformis*, conferring the anti-*C. difficile* barrier effect, is able to establish deeply in the crypts as *C. difficile* does. The fact that *C. fusiformis* is the only flagellate species among the three species of the barrier flora could in part explain its ability to colonize the gut at higher levels than *C. cocleatum* and *C. indolis*. The tissue association in the mouse caecum of a flagellate strain of *C. difficile* was 10-fold lower than that of a flagellate strain (25). This observation is in accordance with the study of Stanton et al. (26), showing a better ability of a wild type, flagellate *Roseburia cecicola* strain, to colonize the gut than a flagellate mutant. Freter et al. (27) showed that motility and chemotaxis positively influence mucus association.

We herein report on the application of new molecular techniques in order to better understand the constitution and the localization of a model *C. difficile* barrier flora.

This is the first step for a more comprehensive work in which we will study the mechanisms of the protective effects of this flora against *C. difficile*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out with financial support from the Commission of the European Community (FAIR contract CT95-0433). We thank Dr Philippe POCHART from the Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris for critical discussions about flow cytometry, and Bruno GOURITIN, from the Département d'Hématologie, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, for his help in cryosectioning.

#### REFERENCES

1. Pryde SE, Richardson AJ, Stewart CS, Flint HJ. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and caecal lumen of a pig. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 5372–7.
2. Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4799–807.
3. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the faecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2578–88.
4. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995; 59: 143–69.
5. Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998; 180: 4765–74.
6. Tannock GW. In: Tannock GW, ed. *A Fresh Look at the Intestinal Microflora. Probiotics: A Critical Review*. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, 1999, Chapter 1.
7. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1157–70.
8. Borriello SP. The influence of the normal flora on *Clostridium difficile* colonisation of the gut. *Ann Med* 1990; 22: 61–7.
9. Su WJ, Bourlioux P, Bournaud M, Besnier MO, Fourniat J. Transfer of the caecal flora of the hamster to the germfree C3H mouse: use of this model to study the flora of the anti-*Clostridium difficile* barrier. *Can J Microbiol* 1986; 32: 132–6.
10. Boureau H, Decre D, Popoff M, Bertocci A, Su WJ, Bourlioux P. Isolation and identification of microflora resistant to colonization by *Clostridium difficile*. *Microecol Therapy* 1989; 18: 117–20.
11. Boureau H, Decre D, Carlier J, Guichet C, Bourlioux P. Identification of a *Clostridium cocleatum* strain involved in an anti-*Clostridium difficile* barrier effect and determination of its mucin-degrading enzymes. *Res Microbiol* 1993; 144: 405.
12. Relman DA. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. *Universal Bacterial 16S rDNA Amplification and Sequencing, Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. Rochester: Mayo Foundation, 1993: 489.
13. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 10881–90.
14. Maidak BL, Cole JR, Parker Jr CT, et al. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 171–3.

15. Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 1993; 14: 136–43.
16. Collins MD, Lawson PA, Willems A, et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combination. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 812–26.
17. Boureau H, Salanon C, Decaens C, Bourlioux P. Caecal localisation of the specific microbiota resistant to *Clostridium difficile* colonisation in gnotobiotic mice. *Microb Ecol Health Dis* 1994; 7: 111–7.
18. Jensen TK, Boye M, Moller K, Leser TD, Jorsal SE. Association of *Serpulina hyodysenteriae* with the colonic mucosa in experimental swine dysentery studied by fluorescent *in situ* hybridization. *Apmis* 1998; 106: 1061–8.
19. Licht TR, Krogfelt KA, Cohen PS, Poulsen LK, Urbance J, Molin S. Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by *Salmonella typhimurium* studied by *in situ* hybridization. *Infect Immun* 1996; 64: 3811–7.
20. Nordentoft S, Christensen H, Wegener HC. Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for *in situ* detection of *Salmonella serovars* in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2642–8.
21. Hopkins MJ, Macfarlane GT. Evaluation of 16S rRNA and cellular fatty acid profiles as markers of human intestinal bacterial growth in the chemostat. *J Appl Microbiol* 2000; 89: 668–77.
22. Porter J, Deere D, Pickup R, Edwards C. Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry* 1996; 23: 91–6.
23. Van der Waaij LA, Mesander G, Limburg PC, Van der Waaij D. Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human faeces. *Cytometry* 1994; 16: 270–9.
24. Nielsen EM, Schlundt J, Gunvig A, Jacobsen BL. Epithelial, mucus and lumen subpopulations of *Escherichia coli* in the large intestine of conventional and gnotobiotic rats. *Microb Ecol Health Dis* 1994; 7: 263–73.
25. Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun* 2001; 69: 7937–40.
26. Stanton TB, Savage DC. Motility as a factor in bowel colonization by *Roseburia cecicola*, an obligatory anaerobic bacterium from the mouse caecum. *J Gen Microbiol* 1984; 130: 173–83.
27. Freter R, O'Brien PC, Macsai MS. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: *in vivo* studies. *Infect Immun* 1981; 34: 234–40.

- **Publication 2 : soumise à Journal of Applied Microbiology**

## **Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence**

**V.Thomas<sup>1</sup>, T. Bouchez<sup>2</sup>, V. Nicolas<sup>3</sup>, S. Robert<sup>4</sup>, J.F. Loret<sup>4</sup> and Y. Lévi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Public Health-Environment, School of Pharmacy, University of Paris Sud-11, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France*

<sup>2</sup>*Cemagref, Groupement d'Antony – Parc de Tourvoie – BP44, 92163 Antony Cedex*

<sup>3</sup>*IFR75 – ISIT, Plateau Technique d'Imagerie, School of Pharmacy, University of Paris Sud-11, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France*

<sup>4</sup>*Suez-Environnement, CIRSEE, 38 Avenue du Président Wilson, 78230 Le Pecq, France*

Abbreviated running headline: Drinking water disinfection

*Corresponding author : Vincent Thomas, Laboratoire Santé Publique Environnement, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud-11, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France, e-mail : vincent.thomas@cep.u-psud.fr, tel 33 (1) 46 83 58 55, fax 33 (1) 46 83 5732*

### **SUMMARY**

**Aims:** Monitoring of microbial changes during and after application of various disinfection treatments in a model domestic water system.

**Methods and Results:** A pilot-scale domestic water system consisting of seven galvanized steel re-circulation loops and copper dead legs was constructed. Culture techniques, confocal laser scanning microscopy after fluorescent *in situ* hybridization and viability staining with the BacLight<sup>®</sup> LIVE/DEAD kit were used for planktonic and biofilm flora monitoring.

Before starting the treatments, the system was highly contaminated with *L. pneumophila* and biofilm populations mainly consisted of  $\beta$ -*Proteobacteria*. In the water and the biofilm of the loops, continuous application of chlorine dioxide (0.5 mg l<sup>-1</sup>), or chlorine (2.5 mg l<sup>-1</sup>) were very effective in reducing the microbial flora, including *L. pneumophila*. Heterotrophic bacteria, although strongly reduced, were



still detectable after ozone application ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ), whereas with monochloramine ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ) and copper-silver ionization ( $0.8 / 0.02 \text{ mg l}^{-1}$ ), the contamination remained significantly higher. Monochloramine and copper-silver did not remove the biofilm. During copper-silver application, *Legionella* re-growth was observed. Only chlorine dioxide led to detectable effects in the dead leg. Amoebae could not be eliminated, and after interrupting the treatments, *L. pneumophila* quickly recovered their initial levels, in all cases.

**Conclusions:** Chlorine dioxide, applied as a continuous treatment, was identified in this study as the most efficient for controlling *L. pneumophila* in a domestic water system. Chlorine dioxide showed a longer residual activity, leading to improved performance in the dead leg. Amoebae resisted to all of the treatments applied and probably acted as reservoirs for *L. pneumophila*, allowing a quick re-colonization of the system once the treatments were interrupted.

**Significance and Impact of the Study:** Control of microbial contamination requires maintenance of a constant disinfectant residual throughout the water system. Treatment strategies targeting free-living amoebae should lead to improved control of *Legionella pneumophila*. Such treatment strategies still have to be investigated.

**Keywords:** biofilm, domestic water, disinfection, *Legionella*, viability, fluorescence, confocal, amoebae.

## INTRODUCTION

During the last 25 years, a growing attention has been given to the contamination of man-made water systems by *Legionella pneumophila*. Legionellosis outbreaks are still regularly reported and the *per annum* incidence rate of the disease is currently 10 reported cases per million persons in Europe ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)), whereas it has been estimated to 8000–18 000 in the United States (Marston *et al.* 1997).

This ubiquitous Gram-negative rod frequently colonizes man-made aqueous environments such as cooling towers, domestic water systems, humidifiers or whirlpool spas, where it lives a complex “social life” (Fields 2002). Protozoa have been demonstrated to play a major role in *L. pneumophila* transmission. Intra-cellular replication in eukaryotic hosts is probably the only way for this pathogen to multiply in the environment (Abu Kwaik *et al.* 1998). Furthermore, it can survive within *Acanthamoeba* cysts wherein it is protected from the action of biocides (Kilvington

and Price 1990). As a free-living organism, *L. pneumophila* is able to enter a viable but non-culturable state in low-nutrient environments and can persist for long periods in biofilms commonly found in domestic water systems and air conditioning equipments (Murga *et al.* 2001). It is widely admitted that these biofilms play a critical role in the persistence of these bacteria within water systems. Indeed, multiple resistance mechanisms are at work within this embedded community, such as: prevention of disinfectants access to the bacteria by the exopolysaccharide matrix (Stewart *et al.* 2001), heterogeneity in physiological activity and genes expression of individual cells leading to different susceptibility (Cochran *et al.* 2000; Wimpenny *et al.* 2000), easier horizontal gene transfer due to the high density of bacteria, facilitating spread of the genes conferring resistance to certain biocides (Molin and Tolker-Nielsen 2003; Schwartz *et al.* 2003b). Furthermore, by supporting amoebal grazing, these biofilms regulate the population of protozoa potentially contaminated by *L. pneumophila* (Kalmbach *et al.* 1997b; Barbeau and Buhler 2001).

Various methods to control *Legionella* in man-made water systems have been described in the literature (Kim *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; Campos *et al.* 2003). These methods consist of physical and / or chemical treatments. However, it is now evident from field practice and recent pilot scale studies that none of these treatments lead to a total eradication of the bacterium, and that re-colonization occurs as soon as the treatments are interrupted (Loret *et al.* 2003, Saby *et al.* 2003).

The aim of this study was to monitor the changes in microbial populations during treatments application in a pilot-scale domestic water system, in order to explain *Legionella* resistance to disinfectants, and re-colonization mechanisms.

Six different disinfection treatments were compared in this study: chlorine, electrochlorination, chlorine dioxide, monochloramine, copper-silver ionization, and ozone.

As classical culture methods can recover only less than 1% of the total flora in oligotrophic systems such as drinking water (Staley and Konopka 1985), various molecular methods were used to monitor the microbial changes. These methods consisted of Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) with oligonucleotidic probes targeting rRNA, and viability staining with the BacLight® LIVE/DEAD kit (Molecular Probes) for biofilm analysis (Manz *et al.* 1993; Kalmbach *et al.* 1997a; Hope and Wilson 2003), in conjunction with confocal laser scanning microscopy and software-aided image analysis.

## MATERIAL AND METHODS

### Pilot unit (Fig. 1)

The pilot-scale domestic water system used in this study consisted of seven identical rigs, each composed of a galvanized steel re-circulation loop (interior / exterior diameter: 26/34 mm – length: 30 m, volume: 16 l) and a copper dead leg (interior / exterior diameter: 20/22 mm, length: 13 m, volume: 4 l). Temperature was maintained at 35°C. Solenoid valves located on the loops and at the outlet of each dead leg allowed automatic discharges of the water, simulating water consumption. These discharges were performed directly from the loops or through the dead legs. The total volume of each loop was completely renewed every day, by steps. Water velocity in the loops was close to 0.1 m s<sup>-1</sup> (200 l h<sup>-1</sup>). Two types of biofilm monitoring devices were installed: PVC cartridges filled with 5 mm glass beads (total surface: 157 cm<sup>2</sup>) for culture and FISH analysis, and 1 cm<sup>2</sup> PVC coupons for non-destructive staining and microscopic observation of biofilms.

### Test program

The study was divided in three stages: colonization, disinfection, and re-colonization. During the colonization stage, a complex ecosystem was established in the pipe work by circulating sand-filtered river water during two weeks, followed by progressive dilution with de-chlorinated drinking water (Table 1) for one month (renewal rate: 25% per day). At the end of this period, the pilot unit was found to be naturally contaminated with a *L. pneumophila* serogroup 1 strain, and an amoebae population consisting of *Acanthamoebae*, *Hartmannella*, and *Vahlkampfia*. In order to increase the level of contamination, the *L. pneumophila* strain was cultured on BCYE agar (Oxoid, France). Once the river water totally replaced by drinking water, the culture was re-suspended in sterile Phosphate Buffer Saline (PBS), and approx. 10<sup>9</sup> cells were injected in each of the seven rigs. The evolution of the ecosystem was then monitored for three months before starting the treatments.

During the disinfection stage, water renewal was set at 100% of the loops volume per day, in ten sequences per day, simulating water consumption. During the two first months, the water was only partially discharged through the dead legs. During this period, the water volume within each dead leg was renewed only by 20% per day. On the third month, the volume of each loop was totally discharged through each corresponding dead leg, in ten sequences per day of 1.5 litre each. The total volume

of each dead leg was then totally replaced by treated water from the loop approximately four times per day. During the disinfection stage, each of six loops received continuous application of one of the following disinfectants: chlorine (2.5 mg l<sup>-1</sup> free chlorine), electro-chlorination (2.5 mg l<sup>-1</sup> free chlorine), monochloramine (0.5 mg l<sup>-1</sup> total chlorine), chlorine dioxide (0.5 mg l<sup>-1</sup>), ozone (0.5 mg l<sup>-1</sup> at the contact column inlet) and copper-silver ionization (0.8 / 0.02 mg l<sup>-1</sup>). The seventh loop was used as a control and remained untreated. All treatments were continuously applied for more than three months (106 days), except monochloramine. In that case, monochloramine concentration in the stock solution used for the study showed a fast decrease and required renewal twice each day. Due to this constraint, the study duration of monochloramine was limited to one month.

For the re-colonization stage, an ultra-filtration unit (Aquasource M1-A35) was installed at the water inlet of the pilot unit prior to treatments interruption, to avoid any contamination from the make-up water.

### **Culture methods**

Standard culture methods were used to monitor the planktonic flora. *L. pneumophila* were isolated according to ISO 11731. Amoebae were enumerated by using a Most Probable Number (MPN) method as described by Pernin *et al.* (Pernin *et al.* 1998). Heterotrophic plate counts (HPC) were obtained by culture on Difco R2A agar at 22°C for 7 days. For biofilm analysis, glass beads were sonicated for two minutes in sterile tap water (60 ml for 200 beads). This suspension was analyzed as described for the planktonic flora.

### **Biofilm architecture and viability**

PVC coupons were removed at days -12, 6, 35 and 106 after treatment initiation for the loops, and at days -12, 51 and 106 for the dead legs. They were stored for a maximum two hours in water from the pilot unit and stained with the BacLight<sup>®</sup> LIVE/DEAD bacterial viability kit (Molecular Probes, L-13512) as recommended by the manufacturer. Biofilms were observed with a Zeiss LSM 510 confocal microscope. A 40x water immersion objective was used. Samples were scanned at 488 nm and syto9<sup>®</sup> (staining living bacteria) was detected through a 498–530 nm bandpass filter whereas propidium iodine (staining dead bacteria) was detected through a 594–680 nm band pass filter. The base surface of each field was 230 µm<sup>2</sup>

and biofilms were analysed by using 1- $\mu\text{m}$  thick optical slices. Four image stacks were acquired for each coupon. ImageJ 1.30v (The National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) implemented with the LSM Reader 3.2b plug-in (<http://ibmp.u-strasbg.fr/sg/microscopie/methods/ij.html>) were used for adding thresholded fluorescent signals of the green and red channels (total biomass). Resulting slices were renamed with the Irfan View 3.85 ([www.irfanview.com](http://www.irfanview.com)) software and image analysis was performed using the Comstat macro developed by A. Heydorn (Heydorn *et al.* 2000), allowing evaluation of total biomass and thickness of biofilms and determination of the live / dead biomass ratio by comparing IP-stained biomass to total biomass for each slice.

### **Fluorescent *in situ* hybridization of biofilms**

The probes used in this study were labelled with Cy5. They are described in Table 2. For biofilm hybridization, glass beads were sampled at days -12 and 6 after treatment initiation, and sonicated for two minutes in sterile water. Supernatant was filtered on 0.22  $\mu\text{m}$  white polycarbonate filters (Millipore). Filters were then immersed for three hours in 4% paraformaldehyde (PFA) ice-cold, washed with sterile distilled water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in a 1:1 mixture of PBS and 96% (v/v) 0.22  $\mu\text{m}$  filtered ethanol (EtOH/PBS). Before hybridization, bacteria were scraped from the filters, washed with EtOH/PBS, re-suspended in three to four ml EtOH/PBS and sonicated again for three minutes. 50  $\mu\text{l}$  were deposited on Teflon poly-lysine coated slides (Merck) and allowed to dry. 50  $\mu\text{l}$  of a 10  $\text{mg ml}^{-1}$  lysozyme solution were deposited on wells for 10 minutes at room temperature before hybridization with MixLGC354 and HGC69a probes. EUB338 mix was hybridized with or without lysozyme permeabilization treatment. The slides were then rinsed in MilliQ water (Millipore), dehydrated and processed as previously described (Manz *et al.* 1992). After *in situ* hybridization, the cells were stained with syto9<sup>®</sup> (6  $\mu\text{M}$  in ice-cold water) for three min. After removing the excess syto9<sup>®</sup> by briefly rinsing the slides with ice-cold MilliQ water, slides were dried with pressurized air and mounted with the SlowFade<sup>®</sup> Antifade reagent (Molecular Probes). Image acquisition was conducted with a Zeiss LSM 510 confocal microscope (63x oil immersion objective). Syto9<sup>®</sup> was detected as described above and Cy5 was detected after excitation at 633 nm through a 650 nm long pass filter. For each hybridization 12 dual colour fields were acquired. They were

then opened in ImageJ with the LSM Reader plug-in. Two 256 grey levels stacks, corresponding to syto9<sup>®</sup> and Cy5 staining for the 12 fields, were created with the LSM Fusion plug-in (<http://ibmp.u-strasbg.fr/sg/microscopie/methods/ij.html>). Slices were then analysed with the Comstat software: for each probe, relative biomass abundance was determined in comparison to syto9<sup>®</sup>-stained biomass.

## RESULTS

### Colonization stage

One month after injection of the cultured strain, planktonic *Legionella* stabilized and remained at the same level until the end of the colonization period. Planktonic populations at that time were comparable in the re-circulation loops and the dead legs (Fig. 2). Among the different rigs, *Legionella* counts ranged from 10 to  $3 \times 10^3$  CFU ml<sup>-1</sup>, amoebae counts from 0.8 to 16 MPN ml<sup>-1</sup>, and HPC from  $2 \times 10^4$  to  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>. In the biofilm however, colonization rates were significantly ( $P < 0.05$ ) higher in the re-circulation loops, in comparison to the dead legs, with respective mean values of  $1.5 \times 10^3$  CFU cm<sup>-2</sup> (vs 40 CFU cm<sup>-2</sup>) for *Legionella*, 40 MPN cm<sup>-2</sup> (vs 2 MPN cm<sup>-2</sup>) for amoebae, and  $3 \times 10^4$  CFU cm<sup>-2</sup> (vs  $6 \times 10^3$  CFU cm<sup>-2</sup>) for HPC.

### Disinfection stage

#### ***Microbial counts in the re-circulation loops***

As shown on Fig. 3, all planktonic and sessile populations remained stable in the control loop throughout the three month study period. In the treated loops, *Legionella* were reduced to undetectable levels in all cases, after day 6, in the water and the biofilm. In the case of copper-silver however, *Legionella* re-growth was observed at the end of the study, in the water and the biofilm as well. HPC were reduced to undetectable levels with chlorine and electro-chlorination, and significantly reduced with chlorine dioxide and ozone. Monochloramine and copper-silver however did not affect HPC significantly during the study.

Some of the treatments reduced planktonic amoebae significantly (ozone, chlorine, electro-chlorination, chlorine dioxide). However, none of them led to undetectable levels in the water, and at day 106, amoebae populations in the biofilms were in all cases comparable to their initial levels, at day -12.

### ***Microbial counts in the dead legs***

As long as the water renewal rate was maintained at 20% per day, no significant change of the planktonic and biofilm populations was observed in the dead legs (data not shown). After seven days of applying a flushing program consisting of totally discharging the loop volumes through the dead legs every day, *Legionella* became undetectable in the water and the biofilm of the dead leg receiving chlorine dioxide. Amoebae and HPC remained unchanged in this dead leg. No change in the planktonic nor sessile microbial populations was observed in the other dead legs.

### ***Changes in the biofilm observed after Live/Dead<sup>®</sup> staining***

As determined by image analysis, values for average thickness and total biomass of main loops biofilms before treatments initiation were low:  $2.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$  and  $0.8 \pm 0.4 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ , respectively (data not shown). For this reason it was decided to estimate biofilm changes by calculating the biomass observed per microscopic field. As in our experiments, the minimum cell amount to perform image analysis was approximately 500 cells / field, the detection limit was  $5 \times 10^2$  to  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  / field.

In the loops, initial biofilm volume per microscopic field as determined by image analysis ranged from  $1.3 \pm 0.7$  to  $7.4 \pm 5.5 \times 10^4 \mu\text{m}^3$  (Fig. 4). The proportion of dead bacteria within these biofilms ranged from  $1.1 \pm 5.6\%$  to  $20.1 \pm 12.8\%$ , with an average value of  $9.9 \pm 6.9\%$ . Variations of the same order were observed among the coupons sampled in the control loop during the disinfection stage.

At day 6, no bacterial biomass could be quantified on coupons treated with ozone, chlorine and electro-chlorination.

With chlorine dioxide, biofilm removal was more progressive. In that case, the biomass value decreased from  $3.1 \pm 1.9 \times 10^4$  to  $1.7 \pm 0.7 \times 10^4 \mu\text{m}^3$  / field at day 6, with a two fold increase in the dead bacteria proportion. However numerous syto9<sup>®</sup>-stained amoebae were present on the microscopic fields (Fig. 5C) and were counted as living bacterial biomass. Therefore the proportion of dead bacteria at day 6 was under-estimated in that case. After day 6, no more biomass was detected with chlorine dioxide.

With monochloramine, the total biomass remained unchanged at approximately  $2.1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$  / field. After a significant increase at day 6, up to  $71.8 \pm 17.8\%$ , the

proportion of dead biomass decreased to 17% at day 35, and living bacteria were still detectable in the biofilm at the end of the treatment period (Fig. 4 & 5).

With copper-silver, the total biomass was significantly reduced from  $7.4 \pm 5.4$  to  $0.6 \pm 0.3 \times 10^4 \mu\text{m}^3$  / field. The proportion of dead biomass increased at day 6, up to  $40.6 \pm 3.1\%$ , but thereafter decreased progressively to  $4.2 \pm 8.2\%$  at day 106.

Only chlorine dioxide reduced the biofilm in the dead leg, leading to undetectable biomass at day 106 (data not shown). In the other dead legs, total biomass remained constant or even increased during the study in some of the rigs, with values ranging from  $1.0$  to  $9.0 \times 10^4 \mu\text{m}^3$  / field. Dead biomass proportions also remained constant or even decreased in some of the rigs, during the study.

### ***Changes in the biofilm observed with fluorescent in situ hybridization***

As described in Table 3, biomass stained with MixEUB338 at day -12 ranged from 25 to 76% of the total syto9<sup>®</sup>-stained biomass, with a mean value of  $45.5 \pm 19.3\%$ . Microbial flora in the loops before treatments initiation was mainly composed of  $\beta$ -*Proteobacteria*, in some cases associated with  $\alpha$ - and  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Bacteria hybridizing with probe SRB385, known as probable sulphate reducing bacteria, were detected in low numbers in some of the rigs. CF319a probe gave no positive signal in any of the samples. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed after hybridization with MixEUB338 probes with lysozyme treatment. No signal conferred by MixLGC354 or HGC69a probes was detected, suggesting that Gram positive bacteria were absent or not detectable (data not shown). The addition of the percentages of biomasses stained with group-specific probes was almost equal to the percentage of MixEUB338-stained biomass in biofilms from the loops thereafter treated with electro-chlorination and chlorine dioxide, and in the control loop. This was not the case in the other samples, indicating the possible presence in high number of micro-organisms that were not detected with our probes set. Few cells were detected with the LEG705 probe in the biofilm from rigs contaminated with at least  $10^3$  *L. pneumophila*  $\text{cm}^{-2}$  (Fig. 6). However, when submitted to image analysis, LEG705- conferred signal was not significantly different from background signal detected after hybridization with Non338 probe (data not shown).

At day 6, no probe- nor syto9<sup>®</sup>- conferred signal was detectable in the biofilms treated with electro-chlorination, chlorine dioxide and chlorine. With monochloramine,



25% of the syto9<sup>®</sup>-stained biomass hybridized with the MixEUB338 probes but none of the group-specific probes gave a positive signal, indicating that an unknown group of micro-organisms had survived the treatment. With ozone and copper-silver, large non-specific fluorescent spots appeared after hybridization, impairing cell detection with the probes. Syto9<sup>®</sup>-staining was unaffected and living cells in the copper-silver-but not in the ozone-treated biofilm were detectable.  $\beta$ - and  $\alpha$ - *Proteobacteria* were detected in the non-treated biofilm at day 6, accounting together for approximately the same percentage of biomass as the one stained with MixEUB338.

### Re-colonization stage

This test consisted of observing the re-colonization of the loops by *L. pneumophila* and amoebae after stopping the treatments. Prior to interrupting the treatments, an ultra-filtration membrane was installed at the water inlet of the pilot unit to avoid any external contamination. A rapid re-colonization of the loops was observed in all cases: *L. pneumophila* recovered within 4 to 5 days their initial concentration in the water and the biofilm. Amoebae also recovered their initial levels. No change was observed in the contaminated dead legs, whereas in chlorine dioxide treated dead leg *L. pneumophila* also recovered their initial concentration.

## DISCUSSION

The colonization procedure applied in this study allowed to establish a stable ecosystem in the pilot scale domestic water system, despite a water renewal rate of 100% per day in each re-circulation loop. The stability of the ecosystem was confirmed in the control rig, during the three-month disinfection stage. The microflora was representative of natural microbial communities typically observed within actual domestic water systems. It was mainly composed of  $\beta$ -*Proteobacteria*, with *Legionella* and amoebae (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*) being present in high numbers. LIVE/DEAD staining and image analysis showed that initial biomass levels on PVC coupons in the re-circulation loops were low and cells were not uniformly distributed on the surfaces (Fig. 5A). At the end of the 120 day colonization period, values calculated with the Comstat software for average thickness and biomass were:  $2.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$  and  $0.8 \pm 0.4 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ , respectively. Values of the same order were recently reported in a study by Martiny *et al.* (Martiny *et al.* 2003) for

drinking water biofilms grown for 94 days on stainless steel coupons:  $4.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$  for average thickness,  $1.6 \pm 0.8 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  for biomass.

According to the results of the culture methods, biofilm development was significantly lower in the copper dead legs, in comparison to the re-circulation loops (Fig. 2). Copper has been reported to have a bactericidal effect and to be constantly less colonized than other materials during assays in a model potable water system containing a complex microbial flora and *L. pneumophila* (Rogers *et al.* 1994). In our case however, biofilms were not recovered from the metal, but from glass beads contained in PVC cartridges, and the level of dissolved copper in the water of the dead legs ( $90 \mu\text{g l}^{-1}$ ) was insufficient to explain the difference in biofilm colonization with the loops. The difference in hydraulics applied to loops and dead legs, and the consequences on nutrient availability can more probably account for this difference in biofilm development.

Biofilm composition obtained by FISH was similar to the composition of drinking water biofilms reported by Kalmbach *et al.* (Kalmbach *et al.* 1997b), describing  $\beta$ -*Proteobacteria* as the dominant group. In our study, glass beads were exposed to colonization for 120 days and biomasses were hybridized with group-specific Cy5-labelled probes and compared to syto9<sup>®</sup>-stained biomasses. Calculated proportions were 45.5%, 3.7%, 27.6%, 3.6% and 0% for MixEUB338, Alpha968, Bet42a, Gam42a and CF319a probes respectively. In Kalmbach *et al.* study, biofilms were grown on glass surfaces inserted in a modified Robbins device and exposed during 70 days to drinking water. Group-specific FLUOS-labeled probes were used and hybridized biomasses were compared to 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained biomasses. Calculated proportions were: 49%, 3%, 34%, 6% and 0% for probes EUB338, Alf1b, Bet42a, Gam42a and CF319a respectively. A similar study was conducted by Schwartz *et al.* with plastic and metallic coupons exposed during four days in a house branch connection supplied with bank-filtered drinking water. They reported significant differences in proportions of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -*Proteobacteria*: 4 to 23% and 27 to 41%, and  $\beta$ -*Proteobacteria* accounted for 33 to 42% (Schwartz *et al.* 1998). The authors suggested that the raw water source used for drinking water production could explain these differences: groundwater in Kalmbach *et al.* study, bank-filtered river water Schwartz *et al.* study. The drinking water used in our study was produced from bank-filtered river water, but the age of the biofilm (four days vs

120 days) and the nature of the material used as support (glass vs plastic and metal) had probably more influence than the origin of the drinking water. The addition of the percentages of biomasses stained with group-specific probes was not equal to the MixEUB338-stained biomasses in biofilms from the loops thereafter treated with ozone, chlorine, monochloramine and copper-silver, indicating the possible presence in high number of micro-organisms that were not detected with our probes set.

All the treatments except copper-silver led to undetected levels of *L. pneumophila* in the water and biofilm of the loops, by culture and FISH methods as well. During copper-silver application, *Legionella* re-colonized the water and the biofilm. Such re-colonization was also observed during long term field studies, in which it was shown that *L. pneumophila* developed a tolerance to silver ions (Rohr *et al.* 1999). In the present study, copper-silver led to the formation of sludge in the re-circulation loop. Copper is known to be able to precipitate at pH values above 6.0 (Lin *et al.* 2002). With a pH value of 7.6 in our case, 90% of the copper should have been present as insoluble complexes in the treated rig. This could also account for the lesser performance of copper-silver in comparison to all other disinfectants. Monochloramine at 0.5 mg l<sup>-1</sup> induced an important increase in dead biomass proportion but syto9<sup>®</sup>-stained bacteria were still present, forming small clusters in the biofilm at day 6 (Fig. 5B). At the same time however, HPC showed no significant change in the biofilm. This could be due to differences in the materials used for biofilm monitoring (glass beads for HPC and FISH, PVC coupons for LIVE/DEAD viability testing). As biofilms grown on glass have been shown to be five times less active than biofilms grown on PVC (Hallam *et al.* 2001), they may be more resistant to disinfection. This could also explain the similar discrepancies observed between HPC and LIVE/DEAD staining with ozone and copper-silver. Similar bacterial resistance to monochloramine was reported with *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* grown together on stainless steel surfaces in continuous-flow annular reactors and treated with 2 mg l<sup>-1</sup> monochloramine: after a 2 h contact time, bacterial respiratory activity persisted deep in the biofilm (Huang *et al.* 1995). In a recent study, Williams *et al.* (Williams and Braun-Howland 2003) evaluated the efficiency of monochloramine against drinking water biofilms grown on ductile iron coupons in a model plumbing system. Biofilms enriched with *Escherichia coli* were left in contact with monochloramine at 4 ppm during 155 h or two weeks, and at 2

ppm for two weeks. They were able to detect *E. coli* and *L. pneumophila* with FISH probes in biofilms exposed for a short time, but not in biofilms exposed for two weeks. In our study, *Legionella* were not detectable any more at day 35, but a selection of bacterial species that did not hybridize with our group-specific probes was observed. This selection led to an increase of the living biomass at day 35 as shown by LIVE/DEAD staining. As it is well known that chloramination for disinfection of drinking water promotes the growth of nitrifying bacteria (Regan *et al.* 2003), we checked the specificity of our probes for these species. The only group that could be detected with our probes was the *Nitrospira* group of nitrite-oxidizing bacteria. In their study, Martiny *et al.* (Martiny *et al.* 2003) showed that species belonging to this genus can represent as much as 78% of the T-RFLP clones in a 256-day-old biofilm grown on stainless steel coupons. As in their study the water supplying the model plumbing system contained no chloramines, it is an hypothesis that in our study these species were present before initiating the treatment and were then selected by monochloramine. However this group should have been found together with ammonia-oxidizing bacteria that release nitrite in presence of chloramines and that should be detected with the Bet42a probe. Further investigations with specific probes for *Nitrospiraceae* would be needed.

Ozone at 0.5 mg/L had an effect throughout the entire recirculation loop against planktonic and biofilm populations, even in the absence of detectable residual after the contact column. This result was surprising, but could be explained by the presence of an ozone residual below detection limits.

Chlorine (as bleach or obtained by electro-chlorination) and chlorine dioxide were the most effective treatments in this study. All of them led to undetectable levels of *L. pneumophila* and microbial flora, whatever the analytical method used, in the water and the biofilm. Compared to chlorine, chlorine dioxide showed a longer residual activity, leading to improved performance in the dead leg. This is consistent with the results of a recent study by Srinivasan *et al.* (2003) in which chlorine dioxide at 0.8 ppm was efficient in controlling *L. pneumophila* contamination in a hospital water distribution system. In this study the disinfection system was operational only 12 hours per day and five days per week.

*Legionellaceae* were detected in this study with the LEG705 probe only as free bacteria, in the biofilm from non-treated glass beads contaminated with at least  $10^3$  *L.*

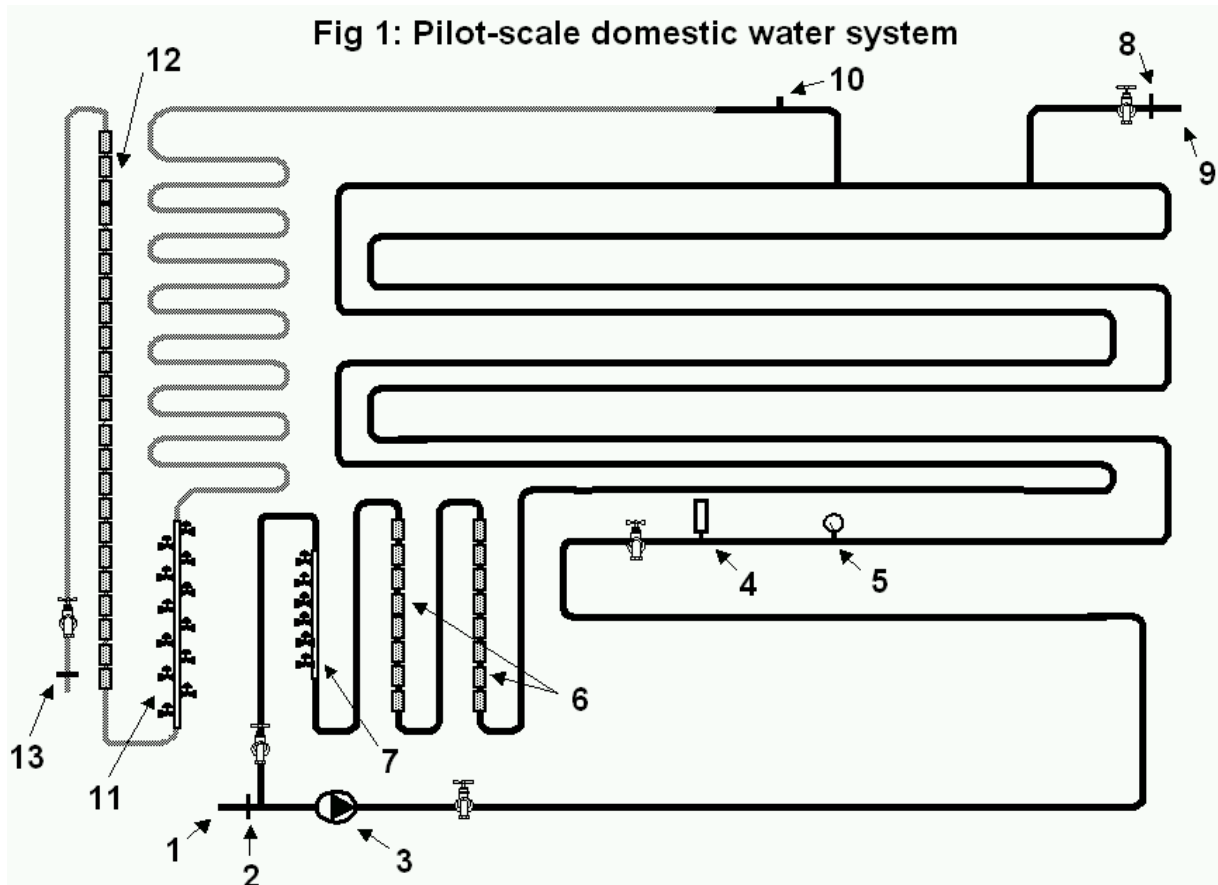
*pneumophila* cm<sup>-2</sup>, where they accounted for less than 1% of the total biomass. With the same probe, Kalmbach *et al.* (Kalmbach *et al.* 1997b) were able to detect *Legionellaceae*, but almost exclusively inside protozoa, where they had a high metabolic activity as indicated by strong hybridization signal. The high detection limit in non-treated biofilms could partly be explained by the fact that *L. pneumophila* differentiate in Mature Intracellular Forms (MIFs) at the end of the intra-amoebal host replication (Garduno *et al.* 2002). These cyst-like forms are short, stubby rods with an electron-dense, laminar outer membrane layer, they are resistant to detergent-mediated lysis and have a very low respiration rate, consistent with a decreased metabolic activity. For these reasons and as it is admitted that intra-cellular replication is probably the only way for *L. pneumophila* to multiply in the environment, it is most likely that free *Legionella* in our case were in the form of MIFs, and therefore were difficult to detect by hybridization with rRNA probes. In the study by Kalmbach *et al.*, hybridization was made directly on coupons supporting the biofilms. In our case, the method used for biofilm sampling, including a sonication of the glass beads, was undoubtedly traumatic for amoebal trophozoites. It is an hypothesis that before starting the disinfection stage, protozoa infected with *Legionellaceae* were present but were destroyed by sonication, releasing metabolically active bacteria that where then hybridized and observed as “free” bacteria. *L. pneumophila* could also have been present in amoebal cysts, but cysts do not allow probes penetration. Alternatively, PCR methods and southern blot hybridization can also be used to detect *L. pneumophila* in such situations, as shown by Schwartz *et al.* (Schwartz *et al.* 2003a).




Although some of the treatments studied (chlorine, electro-chlorination, chlorine dioxide, ozone) reduced significantly planktonic amoebae, none of them led to significant changes in amoebae populations in the biofilm. It has been shown that in some cases, bacterial biofilms increase the number of free-living amoebae (Barbeau and Buhler 2001). In the present study however, bacterial biofilm eradication as observed by HPC and CLSM after treatment with chlorine, electro-chlorination, or chlorine dioxide, had no consequences on amoebae populations in the biofilm. Treatments can also induce amoebae encystment, making them more resistant to sonication and filtration (Pernin *et al.* 1998) and resulting in a paradoxically higher recovering rate by culture methods. It has also been reported that amoebae may

adapt to biocides and that these biocides can have a stimulatory effect (Srikanth and Berk 1993). *Acanthamoeba* spp., one of the amoebae genera present in the pilot-scale domestic water system, is significantly more resistant to adverse conditions than *Hartmannella* and *Naegleria* spp. (Rodriguez-Zaragoza 1994). This higher resistance may be due to the presence of cellulose in their cyst wall (Winiecka-Krusnell and Linder 2001). Furthermore it has been demonstrated that *L. pneumophila* survival in *Acanthamoeba* cysts occur at higher frequencies than in *Hartmannella* cysts (Fields 1993; Greub and Raoult 2003). It is a strong hypothesis that, in our pilot-scale domestic water system, *Acanthamoeba* cysts protected *L. pneumophila* from the disinfectants, and were at the origin of the rapid *Legionella* recolonization observed after treatment interruption. Consequently, amoebae should be considered as the principal target of any disinfection program for *Legionella* control.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank D<sup>r</sup> Jérôme Mutterer for the development and modification of the LSM Reader and LSM Fusion plugins in order to fit our needs. We also thank D<sup>r</sup> Arne Heydorn for kindly providing the Comstat software and D<sup>r</sup> Daniel Perdiz for critical reading of the manuscript. This work was conducted using the MIMOSE molecular microbiology analytical platform from Cemagref Antony which was funded by Région Ile de France.



- 1: Water inlet
  - 2: Non return valve
  - 3: Re-circulation pump
  - 4: Temperature probe
  - 5: Pressure gauge
  - 6: Glass beads for biofilm monitoring (loop)
  - 7: PVC coupons for biofilm monitoring (loop)
  - 8: Solenoid valve (loop)
  - 9: Water outlet
  - 10: Air trap
  - 11: PVC coupons for biofilm monitoring (dead leg)
  - 12: Glass beads for biofilm monitoring (dead leg)
  - 13: Solenoid valve (dead leg)
-  : Water sampling point  
 : Galvanized steel re-circulation loop  
 : Copper dead leg

**Table 1: Physico-chemical characteristics of the water**

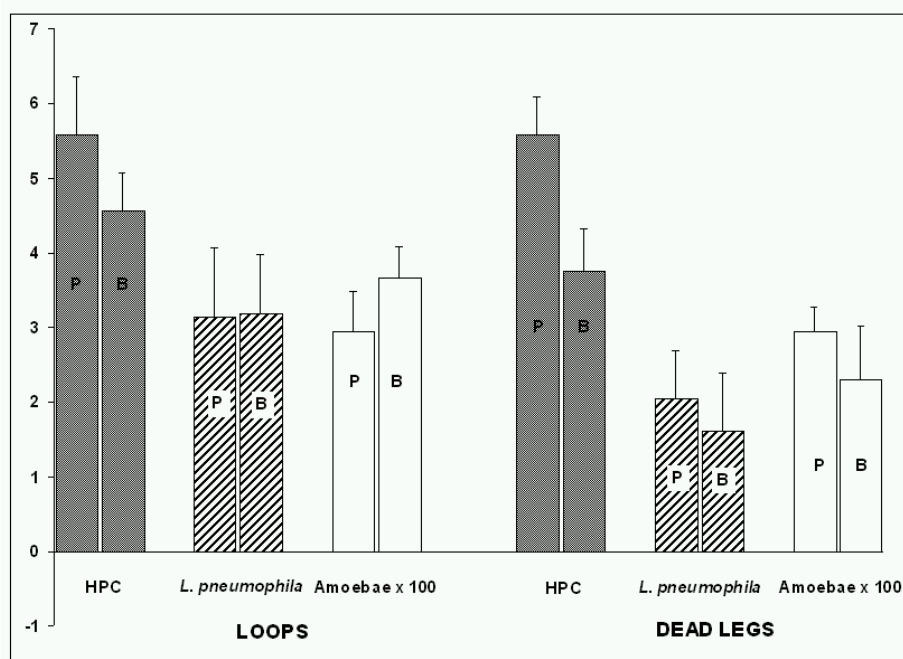
pH	7.6
Turbidity	0.08 NTU
TOC	0.7 – 0.8 mg l <sup>-1</sup>
Dissolved O <sub>2</sub>	8.6%
O <sub>2</sub> saturation	95%
Conductivity	598 µS cm <sup>-1</sup>
Hardness	21 French Grade
Ca <sup>++</sup>	109.8 mg l <sup>-1</sup>
Cl <sup>-</sup>	32 mg l <sup>-1</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	69 mg l <sup>-1</sup>
Fe total	< 20 µg l <sup>-1</sup>
Cu	< 2 µg l <sup>-1</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	256 mg l <sup>-1</sup>

**Table 2 : Oligonucleotidic probes used for *in situ* hybridization**

Probe name	Specificity	Target RNA molecule and site ( <i>E. coli</i> positions)	Probe sequence (5'-3')	% formamide in the hybridization buffer	Ref
EUB338	Domain <i>Bacteria</i>	16S (338–355)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	(Amann <i>et al.</i> 1990a)
EUB338 II	<i>Planctomycetales</i>	16S (338–355)	GCAGCCACCCGTAGGTGT	20	(Daims <i>et al.</i> 1999)
EUB338 III	<i>Verrucomicrobiales</i>	16S (338–355)	GCTGCCACCCGTAGGTGT	20	(Daims <i>et al.</i> 1999)
Non338	Negative control		ACATCCTACGGGAGGC	20	(Manz <i>et al.</i> 1992)
ALF968	Most $\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	16S (968–985)	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	35	(Neef 1997)
BET42a	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	23S (1027-1043)	GCCTTCCCACCTCGTTT	35	(Manz <i>et al.</i> 1992)
GAM42a	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	23S (1027-1043)	GCCTTCCCACATCGTTT	35	(Manz <i>et al.</i> 1992)
SRE385	SRB of the $\delta$ - <i>Proteobacteria</i> (mainly <i>Desulfovibrionaceae</i> ) plus several gram-positive	16S (385-402)	CGGCCTCGCTGCGTCAGG	35	(Amann <i>et al.</i> 1990b)
CF319a	<i>Cytobacter-Flavobacter</i>	16S (319–336)	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	(Manz <i>et al.</i> 1996)
LEG705	<i>Legionella</i>	16S (705-722)	CTGGTGTTCCTTCCGATC	20	(Manz <i>et al.</i> 1995)
HGC69a	Gram-positive High GC	23S (1901-1918)	TATAGTTACCACCGCCGT	20	(Roller <i>et al.</i> 1994)
NHGC	Competitor used with HGC69a	23S (1901-1918)	TATAGTTACGGCCGCCGT	20	(Roller <i>et al.</i> 1994)
LGC354Ae	Gram-positive Low GC	16S (354-371)	TGGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier <i>et al.</i> 1999)
LGC354Be	Gram-positive Low GC	16S (354-371)	CGGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier <i>et al.</i> 1999)
LGC354Ce	Gram-positive Low GC	16S (354-371)	CCGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier <i>et al.</i> 1999)

Probes EUB338, EUB338 II and EUB338 III were used in combination (MixEUB338), as were probes LGC354Ae, LGC354Be and LGC354Ce (MixLGC354). Bet42a probe was used together with unlabelled Gam42a as a competitor to ensure specificity, Gam42a probe being used with unlabelled Bet42a. HGC69a was used together with unlabelled competitor NonHGC targeting *Bacteria* domain except Gram-positive with High GC content.



**Fig 2 : Microbial populations at the end of the colonization stage**

Mean values for HPC (■), *L. pneumophila* (▨) and amoebae (□) in the re-circulation loops (left panel) and dead legs (right panel) are reported. Planktonic flora (P, log cfu ml<sup>-1</sup> for bacteria and log MPN ml<sup>-1</sup> x 100 for amoebae) and biofilm flora (B, log cfu cm<sup>-2</sup> for bacteria and log MPN cm<sup>-2</sup> x 100 for amoebae) are reported.

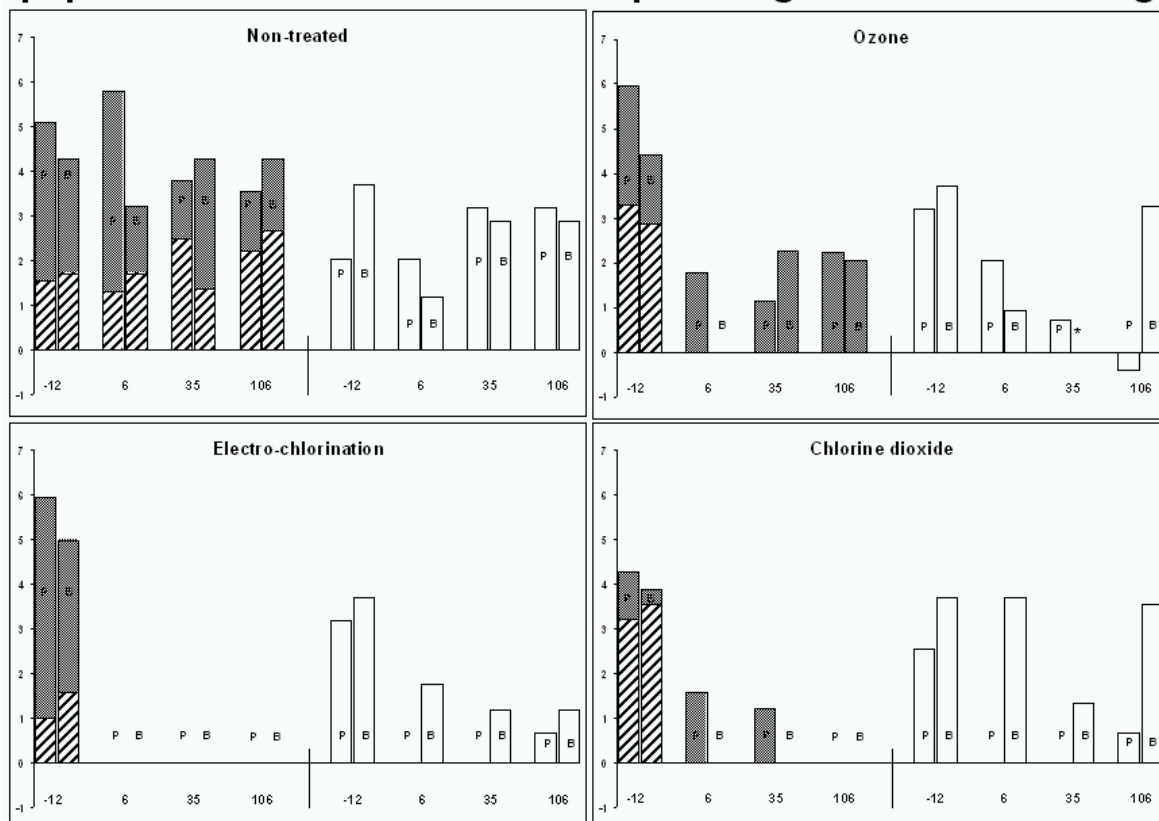
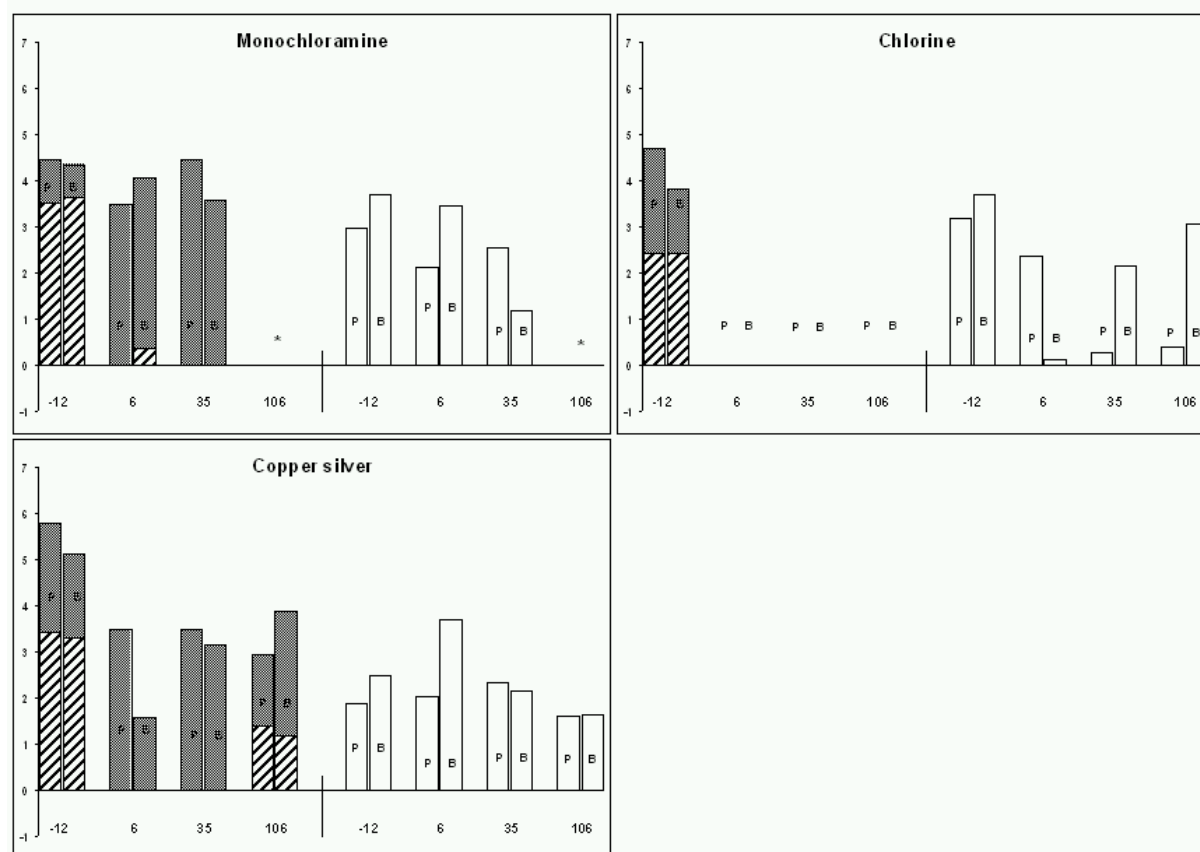
**Fig. 3: Changes in HPC (■), *L. pneumophila* (▨) and amoebae (□) populations in the re-circulation loops during the disinfection stage**

Fig. 3: continued



*L. pneumophila* and HPC values are reported on the same histogram. Planktonic flora (P, log cfu ml<sup>-1</sup> for bacteria and log MPN ml<sup>-1</sup> x 100 for amoebae) and biofilm flora (B, log cfu cm<sup>-2</sup> for bacteria and log MPN cm<sup>-2</sup> x 100 for amoebae) are reported at day -12, 6, 35 and 106 after treatment initiation. Values below detection limit are represented as 0. \*: not determined

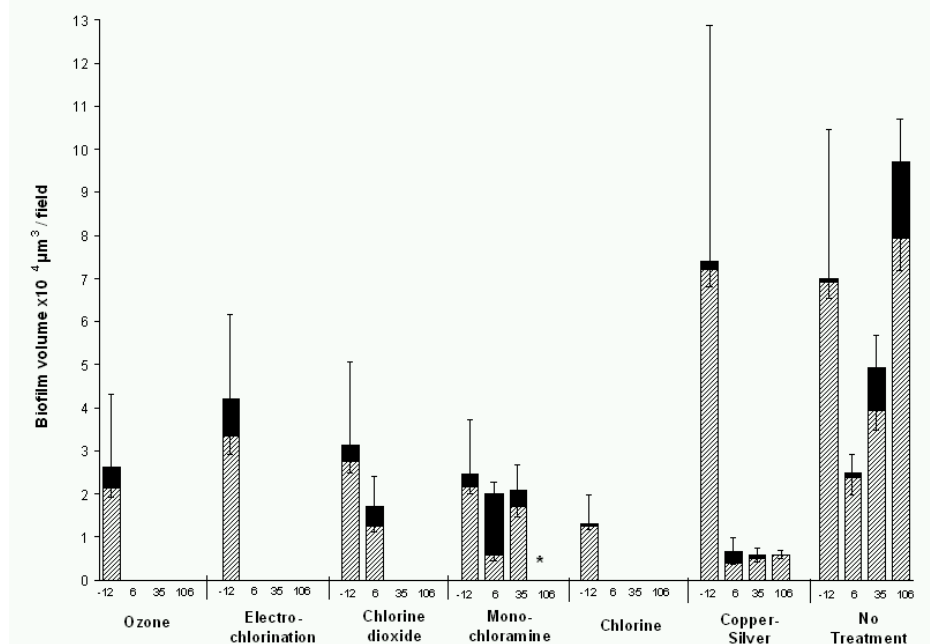
**Table 3: Changes in biofilm composition in the re-circulation loops as determined by FISH**

	Ozone	Electro-chlorination	Chlorine dioxide	Monochloramine	Chlorine	Copper-silver	Ho Treatment
<b>Day -12</b>							
MixEUB338	41,1	71,5	28,6	25,7	28,3	46,7	76,4
Standard deviation	6,2	5,7	8,7	10,7	5,1	20,3	16,0
Alf968	7,8	4,3	0,0	0,0	0,0	3,9	10,1
Bet42a	6,5	62,4	22,1	15,4	12,7	9,2	65,1
Cam 42a	5,3	0,4	2,6	0,0	2,6	0,0	14,5
SRB385	0,3	1,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
Unknown	21,2	3,4	3,9	10,3	12,6	33,5	-13,3
<b>Day 6</b>							
MixEUB338	ND	0,0	0,0	24,9	0,0	ND	37,8
Standard deviation	ND	0,0	0,0	1,8	0,0	ND	9,8
Alf968	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	8,2
Bet42a	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	30,7
Cam 42a	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	0,0
SRB385	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	0,0
Unknown	ND	0,0	0,0	24,9	0,0	ND	-1,1

Results are expressed in percentages of biomass hybridized with group-specific probes compared to total flora stained with syto9<sup>®</sup>. LEG705, CF319a, HGC69a and MixLGC354 probes were not quantifiable and are not reported on this table.

ND : not determined because of large blue fluorescent spots impairing probe-conferred signal detection.

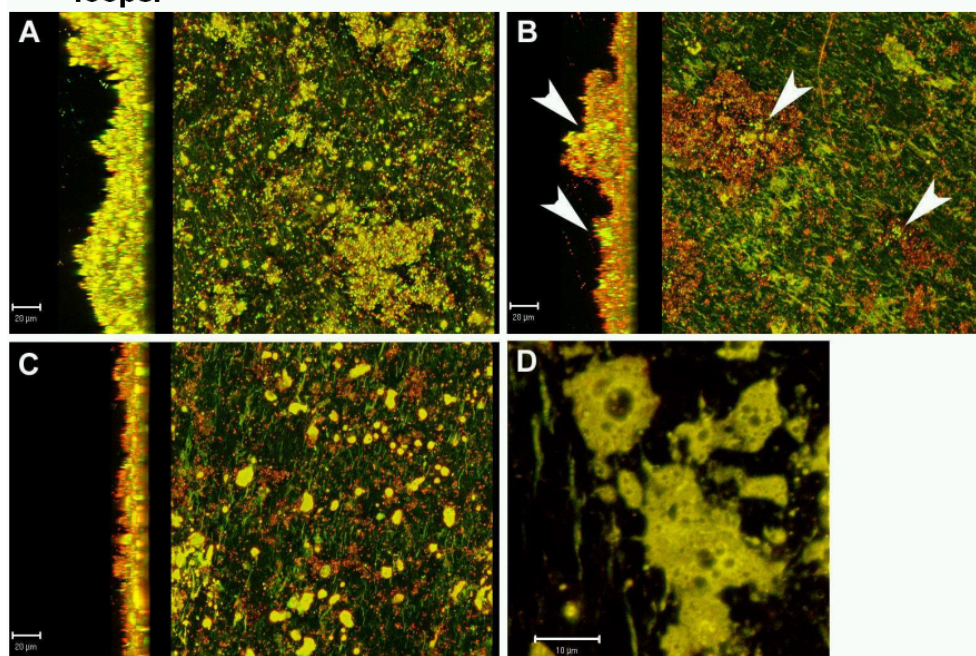
**Fig. 4: Changes in LIVE/DEAD staining and image analysis of biofilms in re-circulation loops**



Dead (■) and living (□) biomasses are represented as percentages of total biomasses observed at days -12, 6, 35 and 106 after treatment initiation.

Top bar represents standard deviation on total biomass, bottom bar represents standard deviation on dead biomass proportion. \*: not determined

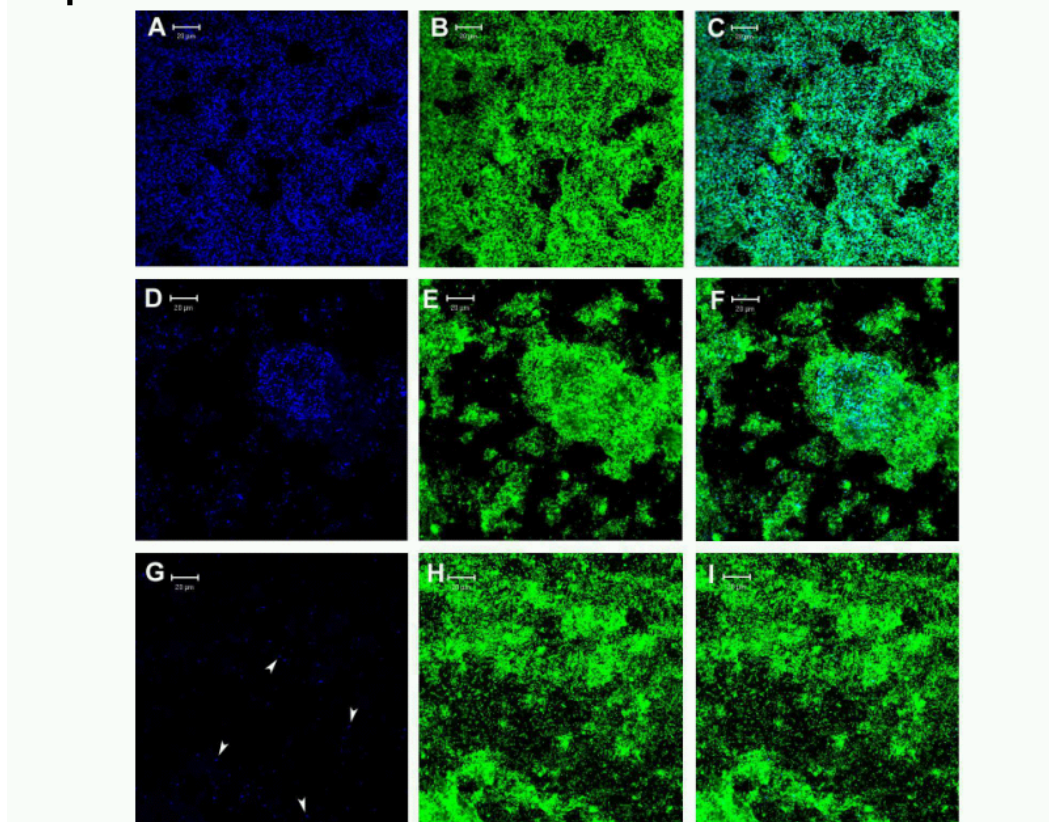
**Fig. 5: LIVE/DEAD staining of biofilms in the re-circulation loops.**



For fields A, B and C sagittal (left) and vertical (right) projections are shown

A: Non-treated biofilm, B: Monochloramine treated biofilm (day 6), arrows indicate clusters of syto9®-stained bacteria, C: Chlorine dioxide treated biofilm (day 6), numerous amoeba-like patterns are present, D: Zoom on amoeba-like patterns observed on picture C.

**Figure 6: Example of FISH patterns on biofilms in re-circulation loops before treatment initiation**



Left : samples hybridized with MixEUB338 (A), Bet42a (D) and LEG705 (G, some hybridized cells are indicated by arrows)

Middle: corresponding fields stained with syto9® (B, E and H respectively)

Right: overlap of the probe and syto9® images (C,F,I)

## REFERENCES

Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C. and Harb, O.S. (1998) Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3127-3133.

Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A. (1990a) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172, 762-770.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. (1990b) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1919-1925.



Barbeau, J. and Buhler, T. (2001) Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Research in Microbiology* 152, 753-760.

Campos, C., Loret, J.F., Cooper, A.J. and Kelly, R.F. (2003) Disinfection of domestic water systems for *Legionella pneumophila*. *Journal of Water Supply: Research and Technology—Aqua* 52, 341-354.

Cochran, W.L., McFeters, G.A. and Stewart, P.S. (2000) Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of Applied Microbiology* 88, 22-30.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. and Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 434-444.

Fields, B. (1993) *Legionella* and protozoa: interaction of a pathogen and its natural host. In *Legionella, Current Status and Emerging Perspectives* ed. Barbaree, J.M., Breiman, R.F., and Dufour, A.P. pp. 129-136. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Fields, B.S. (2002) The social life of Legionellae. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., and Lück, P.C. pp. 135-142. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.

Garduno, R.A., Garduno, E., Hiltz, M. and Hoffman, P.S. (2002) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and Immunity* 70, 6273-6283.

Greub, G. and Raoult, D. (2003) Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmanella vermiformis*. *Research in Microbiology* 154, 619-621.

Hagele, S., Kohler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J. and Steinert, M. (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cellular Microbiology* 2, 165-171.

Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F. and Simms, J. (2001) The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Research* 35, 4063-4071.

Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K. and Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146, 2395-2407.

Hope, C.K. and Wilson, M. (2003) Measuring the thickness of an outer layer of viable bacteria in an oral biofilm by viability mapping. *Journal of Microbiological Methods* 54, 403-410.

Huang, C.T., Yu, F.P., McFeters, G.A. and Stewart, P.S. (1995) Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2252-2256.

Kalmbach, S., Manz, W. and Szewzyk, U. (1997a) Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4164-4170.

Kalmbach, S., Manz, W. and Szewzyk, U. (1997b) Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and *in situ* hybridization. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 265-279.

Kilvington, S. and Price, J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 519-525.

Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A. and Kendall, A.M. (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research* 36, 4433-4444.

Lee, J.V., Surman, S.B., Kirby, A. and Seddon, F. (2002) Nine years experience of novel strategies for *Legionella* control in a large teaching hospital. In *Legionella: Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., and Lück, P.C. pp. 398-401. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.

Lin, Y.S., Vidic, R.D., Stout, J.E. and Yu, V.L. (2002) Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2711-2715

Loret, J.F., Robert, S., Thomas, V., Lévi, Y., Cooper, A.J., Myers, E.R. (2003) Comparison of treatments efficiency for *Legionella* control. Water Quality Technology Conference, Philadelphia, AWWA.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 593-600.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. and Schleifer, K.H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter- bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142, 1097-1106.

Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.H. and Stenstrom, T.A. (1993) *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2293-2298.

Manz, W., Amann, R., Szewzyk, R., Szewzyk, U., Stenstrom, T.A., Hutzler, P. and Schleifer, K.H. (1995) *In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 141, ( Pt 1) 29-39.

Marston, B.J., Plouffe, J.F., File, T.M., Hackman, B.A., Salstrom, S.J., Lipman, H.B., Kolczak, M.S. and Breiman, R.F. (1997) Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization - Results of a population-based active surveillance study in Ohio. *Archives of Internal Medicine* 157, 1709-1718.

Martiny, A.C., Jorgensen, T.M., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. and Molin, S. (2003) Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6899-6907.

Meier, H., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1999) Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 186-196.

Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 255-261.

Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S. and Donlan, R.M. (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147, 3121-3126.

Neef, A. (1997) *Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen*. PhD Thesis. Technical University Munich, Munich, Germany.

Pernin, P., Pelandakis, M., Rouby, Y., Faure, A. and Siclet, F. (1998) Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 955-959.

Regan, J.M., Harrington, G.W., Baribeau, H., De Leon, R. and Noguera, D.R. (2003) Diversity of nitrifying bacteria in full-scale chloraminated distribution systems. *Water Research* 37, 197-205.

Rodriguez-Zaragoza, S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* 20, 225-241.

Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. and Keevil, C.W. (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1585-1592.

Rohr, U., Senger, M., Selenka, F., Turley, R. and Wilhelm, M. (1999) Four years of experience with silver-copper ionization for control of *Legionella* in a german university hospital hot water plumbing system. *Clinical Infectious Diseases* 29, 1507-1511.

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1994) *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides [published erratum appears in *Microbiology* 1995 May;141(Pt 5):1267]. *Microbiology* 140, ( Pt 10) 2849-2858.

Saby, S., Vidal, A., Giloupe, S., Tournieux, D., Suty, H. (2003) The resistance of *Legionella* to disinfection explained by experiments on a hot water distribution system. Water Quality Technology Conference, Philadelphia, AWWA.

Schwartz, T., Hoffman, S. and Obst, U. (1998) Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Research* 32, 2787-2797.

Schwartz, T., Hoffmann, S. and Obst, U. (2003a) Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *Journal of Applied Microbiology* 95, 591-601.

Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B. and Obst, U. (2003b) Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 325-335.

Srikanth, S. and Berk, S.G. (1993) Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3245-3249.



Srinivasan, A., Bova, G., Ross, T., Mackie, K., Paquette, N., Merz, W. and Perl, T.M. (2003) A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control *Legionella* species in a hospital water supply. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 24, 575-579.

Staley, J.T. and Konopka, A. (1985) Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* 39, 321-346.

Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F. and Rees, W.M. (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *Journal of Applied Microbiology* 91, 525-532.

Williams, M.M. and Braun-Howland, E.B. (2003) Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5463-5471.

Wimpenny, J., Manz, W. and Szewzyk, U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 661-671.

Winiiecka-Krusnell, J. and Linder, E. (2001) Bacterial infections of free-living amoebae. *Research in Microbiology* 152, 613-619.

- **Publication 3, soumise à "Journal of Water and Health"**

## **COMPARISON OF DISINFECTANTS FOR BIOFILM, PROTOZOA AND *LEGIONELLA* CONTROL**

J.F. Loret\*, S. Robert\*, V. Thomas\*\*, A.J. Cooper\*\*\*, W.F. McCoy\*\*\*, Y. Lévi\*\*

\* SUEZ ENVIRONNEMENT, CIRSEE – 38 rue du Président Wilson, 78230 Le Pecq, FRANCE. Phone : +33 (0)1 34 80 22 76. Fax : +33 (0)1 30 53 62 07. Email: jean-francois.loret@suez-env.com

\*\* Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Chatenay-Malabry cedex, France. Email : yves.levi@cep.u-psud.fr

\*\*\* Ondeo Nalco, One Ondeo Nalco Center, Naperville, IL 60563-1198, USA. Phone: +1 630 305 1114. Fax: +1 630 305 2982. Email: wmccoy@nalco.com

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to compare the efficiency of different disinfectants applicable to *Legionella* control in domestic water systems. A domestic water supply simulation unit that allowed simulation of real-world conditions was developed for this purpose. The system, consisting of seven identical rigs, was used to compare treatment efficiency under equivalent conditions of system design, materials, hydraulics, water quality, temperature, and initial contamination. During the study, each of six loops received continuous application of one of the following disinfectants: chlorine, electro-chlorination, chlorine dioxide, monochloramine, ozone, or copper/silver. The seventh loop was used as a control and remained untreated. Performance evaluation of these disinfectants was based on their ability to reduce not only *Legionella*, but also protozoa and biofilms, which contribute to the establishment and dissemination of these bacteria in water systems, and their

resistance to treatments. As regards to these criteria, chlorine dioxide and chlorine (as bleach or obtained by electro-chlorination) were the most effective treatments in this study. However, in comparison to chlorine, chlorine dioxide showed a longer residual activity in the system, which constituted an advantage for the disinfection of extensive pipework systems.

## KEY WORDS

Biofilm, disinfection, *Legionella pneumophila*, protozoa.

## INTRODUCTION

Treatments to control *Legionella* have been evaluated and reviewed (Botzenhart 2002; Kim 2002; Campos 2003). Although use of model plumbing systems has been reported in some cases (Muraca 1987; Pavey 1996; Pavey 1998), careful study of this literature indicated no previously published comparative performance data for domestic water service treatments in well-controlled experiments that quantitatively simulate real world conditions. Further, no previously published study provided information about comparative performance of domestic water service treatments for control of the protist hosts of the pathogen, nor in biofilm control, all in the same study.

The purpose of this study was to provide quantitative comparative performance evaluations of chlorine, chloramine, chlorine dioxide, electrolytically oxidized halide, ozone, and copper/silver ionization in tightly controlled, reproducible experiments that simulate conditions in typical building (domestic) water service. The goal of producing these data was to provide scientifically defensible evidence regarding the efficacy of treatments and also, to provide guidance for optimizing application of the treatments.

During the 16 years since the first published guidance appeared in 1987 after the Stafford, UK outbreak of 1985, government-sponsored codes of practice to reduce the risk of legionellosis have been established in many countries including the United Kingdom, Australia, New Zealand, Germany, United States, The Netherlands, Spain, France and Singapore. Common to all this guidance are the essential concept elements of prevention and control: risk assessment, remediation (cleaning and

disinfection), pathogen concentration analysis, monitoring and control. Specifications about control treatments in these documents are not based on rigorously obtained evidence of performance. There is a need for evidence-based recommendations in government-sponsored codes of practice.

At least several hundreds of thousands of people have suffered from legionellosis, the condition of being infected by bacteria in the genus *Legionella*, during the 27 years since recognition of the disease. The per annum morbidity rate in developed countries is 6 to 70 reported cases per million persons. The mortality rate is 2-11% in community outbreaks and as high as 50% for certain nosocomial cases. Long-term debilitating effects from the acute pulmonary disease are often evident even in people who recover. Thus, legionellosis is a serious disease; it is also a preventable disease (Botzenhart 2002).

Legionellosis is preventable because it results from pathogen proliferation in warm water systems and then, dissemination from those systems in pathogen-laden aerosols that contact susceptible people. Almost always, legionellosis is sporadically associated with warm water systems in buildings or industrial water-cooling systems. Control of the disease depends upon managing its root-cause. Improperly maintained warm water systems in which pathogen proliferation occurs as the result of growth within protist hosts associated with biofilms is indisputably known to be the root-cause of this serious and preventable disease.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Pilot unit design and construction***

The domestic water supply simulation unit developed for this study (figure 1 and picture 1) was composed of seven identical rigs. Each rig was designed to simulate the domestic water system of a five-floor building, and included:

- 30 meters of recirculation loop made of galvanized steel (interior/exterior diameter : 26/34 mm, total water volume: 16 liters);
- 13 meters of copper dead leg (interior/exterior diameter: 20/22 mm, total water volume: 4 liters).

The entire system was supplied with potable water, dechlorinated through an activated carbon filter, and maintained at 35°C. Thermal regulation was achieved through the use of a calorifier for the make-up water to all seven rigs, and of heating cables and insulation sheaths for the pipes.

Solenoid valves located on the loops and at the outlet of each dead leg allowed automatic discharges of the water, simulating water consumption. These discharges were performed directly from the loops or through the dead legs. The total volume of each loop was completely renewed every day, by steps. Water velocity in the loops was approximately 0.1 m/s (200 l/h).

Taps were installed at different places of the system for water sampling.

Two types of biofilm monitoring devices were installed on the loops and dead legs :

- PVC compartments filled with 5 mm glass beads, allowing quantitative microbiological analysis.
- PVC Robbins-type devices, with 1 cm<sup>2</sup> coupons, allowing direct microscopic observation of the biofilm.

Corrosion coupons, consisting of 10 cm pipe sections, were connected in series within the recirculating loops and dead legs. Mild and galvanized steel coupons were installed in the loops. Admiralty brass and copper coupons were installed in the dead legs.

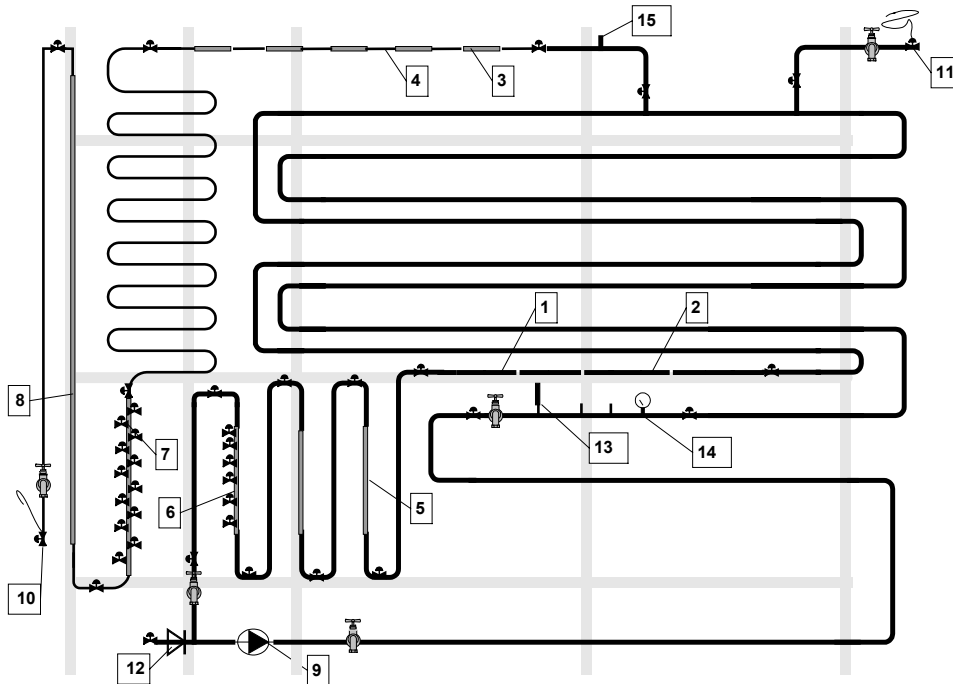
### **Sample processing**

Water samples were analyzed immediately after sampling.

Glass beads for biofilm analysis were soaked in sterile water, sonicated for two minutes, and the resulting suspension was analyzed.

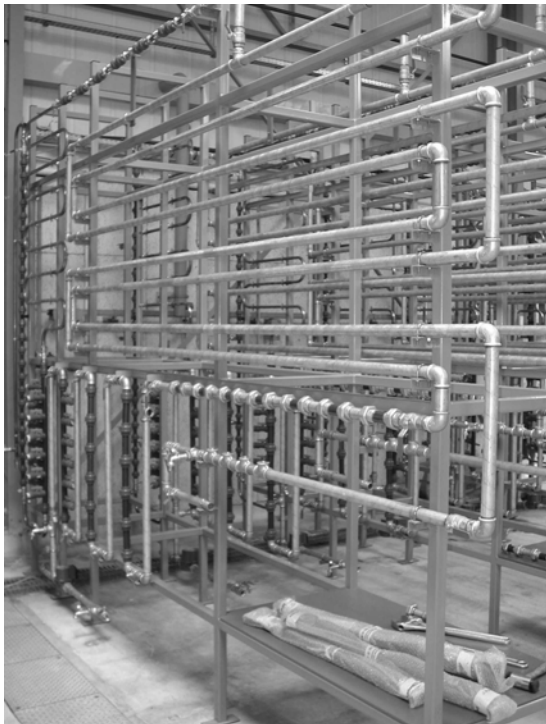
*Legionella* were analyzed according to ISO 11731 culture plate assay (culture on buffered charcoal-yeast extract with 0.1% α- ketoglutarate agar, supplemented with L-cysteine, iron and GVPC, at 37°C).

Amoebae were analyzed by zone assay on coliform culture, according to the filtration method described in (Pernin 1998). Plates were incubated at 30°C.



**Figure 1 :** Domestic water supply simulation unit

1: Galvanized steel coupons, 2: Mild steel coupons, 3: Copper coupons, 4: Brass coupons, 5 and 8: Glass beads for biofilm monitoring, 6 and 7: PVC coupons for biofilm monitoring, 9: Recirculation pump, 10 and 11: Solenoid valves, 12: Non return valve, 13: Temperature probe, 14: Pressure gauge, 15: Air trap.



**Picture 1 :** Domestic water supply simulation unit during construction

Coupons for biofilm observation were preserved in water from the corresponding loop for a maximum two hours after sampling. Coupons were then submitted for microscopic analysis after using the Live/Dead® BacLight™ staining method (Molecular Probes). A Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope, equipped with a 40x water immersion objective was used. Samples were scanned at 488 nm. Syto9 (live bacteria) was detected through a 498–530 nm bandpass filter, and propidium iodine (dead bacteria) was detected through a 594–680 nm bandpass filter. Biofilm was analyzed in 1µm optical slices. At least four microscopic fields were acquired for each coupon. Biofilm thickness was determined by using the ImageJ software.

Chlorine concentrations were checked by diethyl-phenylene diamine (DPD) spectrophotometric method (ISO 7393-2).

Copper was monitored by an electro-chemical method (Palintest SA-1000 portable analyzer).

Corrosion coupons were removed from the system, washed in a solution of passivated acid (10% hydrochloric acid for mild steel, 30% sulfamic acid for galvanized steel, 30% hydrochloric acid for copper and brass, and 10% formaldehyde) to eliminate corrosion residues. Coupons were then rinsed, dried and weight loss was determined.

Disinfection by-products were analyzed according to ISO 10301 for trihalomethanes (THM), USEPA method 300.1 for chlorite, and ISO 15061 for bromate.

### **System preparation**

Sand filtered river water was circulated in the loops and dead legs for two weeks. It was then progressively replaced by tap water, at a renewal rate of 25% per day, until stabilization of the water quality at the outlet of the system (approximately one month). This procedure led to the establishment in the system of a natural *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain, and an amoebae population consisting of *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, and *Vahlkampfia*.

To increase the *Legionella* population, the natural *Legionella* strain was cultured on BCYE agar with cysteine at 37°C, re-suspended in sterile phosphate buffered saline, and re-injected into the system. The *Legionella* population stabilized at  $10^5$  (+/- 0.7

log) CFU/L four weeks after inoculation. The stability of the population was observed for two months before starting the disinfection studies.

Amoebae concentrations in the system water stabilized at  $5 \times 10^3$  (+/- 0.6 log) MPN/L.

### ***Test program***

During three months, each of six loops received continuous application of a single treatment. The seventh loop was used as a control and remained untreated.

Six disinfectants were studied, with the following targeted doses. Except for ozone, the dose indicates the residual maintained in the recirculation loop.

- Chlorine (sodium hypochlorite) at 2 mg/L (expressed as free chlorine)
- Electro-chlorination at 2 mg/L (expressed as free chlorine)
- Monochloramine at 2 mg/L (expressed as total chlorine)
- Chlorine dioxide at 0.5 mg/L (expressed as chlorine dioxide)
- Ozone at 0.5 mg/L at the contact column inlet
- Copper/silver at 0.5/0.01 mg/L.

During the two first months, the water was only partially discharged through the dead legs. During this period, the water volume within each dead leg was renewed only by 20% per day. A single flushing was performed at the end of the first month on all dead legs using five liters from each corresponding loop. The total volume of each dead leg was thus totally replaced by disinfected water from the loops. On the third month, the volume of each loop was totally discharged through each corresponding dead leg, in ten sequences per day of 1.5 liter each. The total volume of each dead leg was then totally replaced by treated water from the loop approximately four times per day.

Water samples for microbiological analyses were taken on each rig every day during the first week, and then once a week throughout the rest of the study.

Biofilm samples were taken once a week during the first month, and then once each month.



Sodium hypochlorite, electro-chlorination, chlorine dioxide, and monochloramine residual concentrations were monitored by spectrophotometric method on a daily basis. Copper in the rig treated with copper/silver was checked once a week. Silver concentration was not monitored, since it was designed to be proportional to copper concentration, with a silver/copper ratio of 2%.

Corrosion coupons were taken after the second and third months. At the end of the second month, water samples were taken in the loops for disinfection by-products determination.

### ***Disinfectant generation and dosage control***

Sodium hypochlorite, electro-chlorination, chlorine dioxide, and monochloramine disinfectants were prepared in advance and injected from a stock solution stored in a tank. Five liters were prepared each time, corresponding to a four to five day consumption. All stock solutions were prepared in the same concentration range (400 – 600 mg/L):

- A 5 % sodium hypochlorite solution was diluted to 500 mg/L solution.
- A 600 mg/L free chlorine solution was prepared by electro-chlorination, from a 10g/h free chlorine capacity generator. The electrolytic cell was operated at 12 Volts and 10 to 12 amps, and was fed with a 15 g/L sodium chloride solution. Only the anode stream was collected.
- For chlorine dioxide, an Envirox 1000 electrochemical chlorine dioxide generation unit (5g/h capacity, Ondeo Nalco Company), generating a 500 mg/L chlorine dioxide solution, was used. The unit was fed with de-ionized water (Millipore Milli RX-20) and a 5% sodium chlorite solution (Ondeo Nalco Envirox PWT). Only the anode stream was collected.
- Monochloramine was prepared by mixing sodium hypochlorite with ammonia at a chlorine to ammonia molar ratio of 2:1, as described in (White 1999).

Prominent amperometric controllers were used to control the doses of these disinfectants. The following probes were installed in the loops, downstream of the injection points:

- Dulcotest® CGE 2mA for chlorine and electro-chlorination
- Dulcotest® CDP 1mA for chlorine dioxide
- Dulcotest® CTE 1mA for monochloramine.

Ozone was produced from a TOGC2 ozone generator (10g/h capacity, Ozonia company). The generator was fed with oxygen and produced an ozone concentration of 4 g/m<sup>3</sup> in the oxygen flow. Ozone production was continuously monitored with an on-line BMT 961 ozone analyzer (Messtechnik), and injected through an eductor into a 16 liter contact column, connected in series to the loop to allow treatment of the entire recirculating water flow. The ozonated oxygen flow was adjusted to achieve an ozone/water ratio of 0.5 mg/L at the contact column inlet. No ozone residual was detected at the outlet of the contact column (< 0.1 mg/L).

Copper and silver were delivered by a LP2-5 system, designed to treat water flows up to 15 m<sup>3</sup>/h (Sanichem company). The ionization chamber, containing two electrodes made of copper/silver alloy, was placed in the loop for continuous treatment of the entire flow. The polarity of the electrodes was regularly and automatically inversed to ensure a homogeneous ionization of both electrodes. The ionization intensity was first set at the maximum level during the three first weeks, and was then reduced by half until completion of the studies.

## RESULTS

### *Dosage control*

Sodium hypochlorite, electro-chlorination, and chlorine dioxide stock solutions were stable after preparation and during the five-day storage time. Monochloramine stock solutions showed a fast decrease of concentration. Therefore, monochloramine required renewal of the stock solution twice each day. This constraint reduced the study duration of monochloramine to one month, instead of three.

The amperometric sensor used for chlorine dioxide performed correctly throughout the study. However, the amperometric sensors for chlorine, electro-chlorination and monochloramine failed at the end of the second day. Re-generating the probes and replacing membranes restored their function, but not for more than 48 hours. Therefore, they were replaced by timer devices allowing automatic timed injection of these oxidants.

Table 1 presents the disinfectant values recorded in each recirculating loop. The targeted dosage of 0.5 mg/L could be achieved accurately in the rig treated with chlorine dioxide, throughout the study. The less precise dosage control in the loops treated with chlorine and electro-chlorination led to over-dosage of these oxidants (2.40 and 2.75 mg/L respectively, on average) and to significant variations of the concentrations. Variations of the same order are commonly observed in real systems where oxidation-reduction (redox) controllers are used. In the case of monochloramine, the average dosage was only 0.5 mg/L instead of the targeted 2 mg/L because of monochloramine instability in the stock solution.

Ozone concentration in the oxygen flow showed a maximum variation of 30% around the 4 g/m<sup>3</sup> set point.

The copper concentration in the loop treated with copper/silver was irregular during the three week period treatment at the high intensity setting on the ionization unit. Reducing the intensity by half on the ionization unit led to more constant copper residual in the loop, but the average copper level remained higher than the targeted value. Copper-containing sludge, red staining of the water, and copper deposits on the inner surface of the pipes were observed in this loop.

Treatment dose (mg/L)	Chlorine dioxide	Chlorine	Electro-chlorination	Mono-chloramine	Copper (1)	Copper (2)
Average	0.50	2.40	2.75	0.50	2.15	0.75
Standard deviation	0.15	2.25	2.10	0.80	2.35	0.35

**Table 1** : Disinfectant dosage achieved in the recirculating loops

(1) maximum ionization intensity (2) half ionization intensity

## ***Disinfection***

### **Loops**

Unlike the dead legs, which received discontinuous injections of treated water, the loops were treated continuously to maintain disinfectant residual concentrations. The loops exhibited rapid decreases in microbial contamination.

#### **Planktonic *Legionella*** (Figure 2)

The planktonic *Legionella* population in the control loop remained stable throughout the three month study period, at  $2.6 \times 10^5$  (+/- 1.1 log) CFU/L.

Each disinfectant achieved rapid initial results in the treated loops. *Legionella* populations decreased to undetected levels (< 500 CFU/L) within the first three days of treatment, in all cases. However, *Legionella* remained undetected over the whole study period only with sodium hypochlorite, electro-chlorination, chlorine dioxide and monochloramine. Ozone and copper silver allowed occasional reemergence of detectable *Legionella* in the bulk water.

With ozone treatment, three peaks of contamination were observed during the studies. After two weeks of treatment however, the contamination remained below  $10^3$  CFU/L.

A greater number of positive samples were found with copper/silver treatment. Following the initial decrease in *Legionella* concentrations, five of six *Legionella* samples were positive in the copper/silver-treated loop, and *Legionella* concentrations had increased to greater than 10000 CFU/L in this loop by the conclusion of the study.

#### **Sessile *Legionella*** (Figure 3)

The sessile *Legionella* population in the control loop remained stable throughout the study period, at 150 (+/- 1.3 log) CFU/cm<sup>2</sup>.

No viable *Legionella* cells were detected in the biofilm after six days of treatment in the loops treated with sodium hypochlorite, electro-chlorination, chlorine dioxide, monochloramine, or ozone (< 1 CFU/cm<sup>2</sup>). Viable *Legionella* cells were still detected in biofilm from the loop subjected to copper/silver treatment.

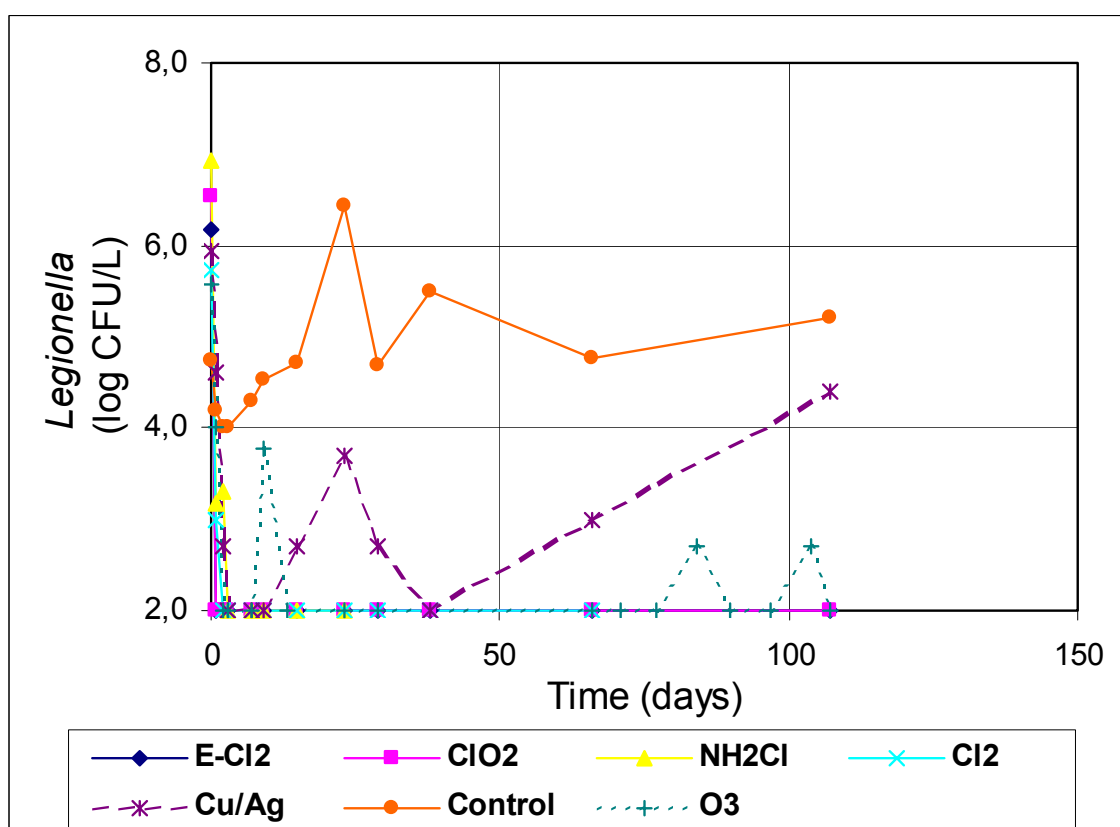
### Planktonic amoebae (Table 2)

The planktonic amoebae population in the control loop remained stable during the studies, at  $10^4$  (+/- 0.8 log) cysts/L.

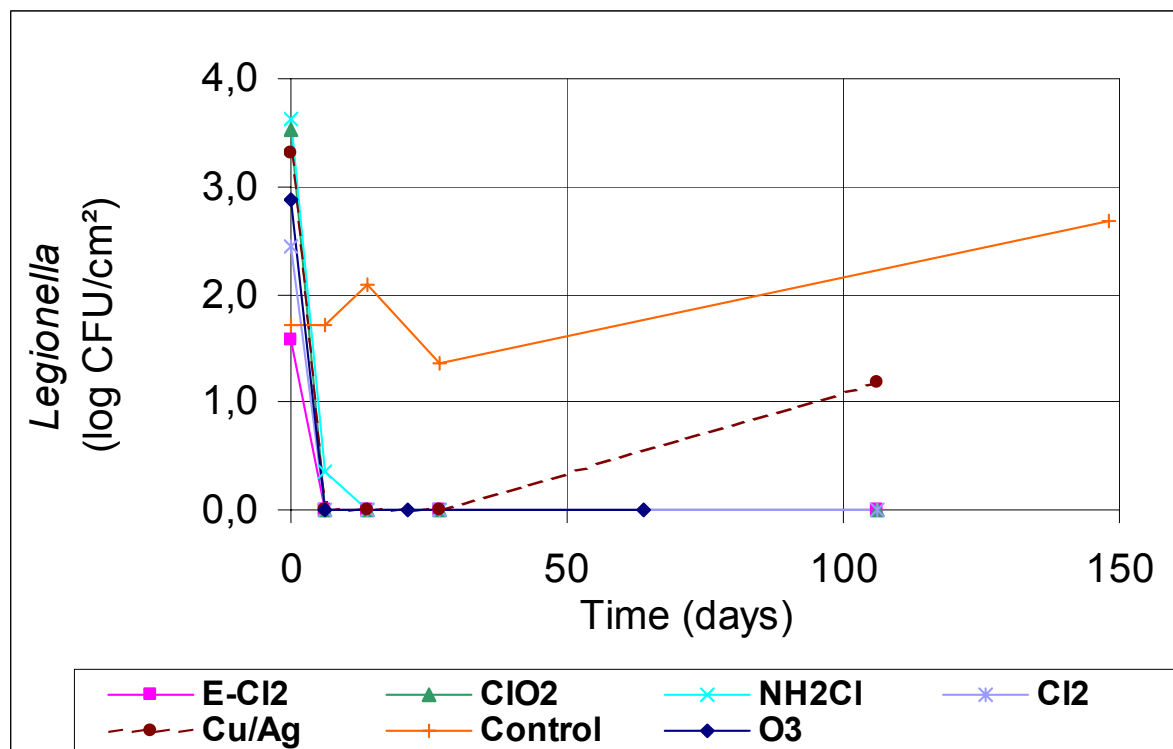
Copper/silver and monochloramine did not significantly reduce amoebae cyst concentrations. All other treatments reduced cyst concentrations significantly, but no treatment eliminated cysts entirely from the bulk water of each loop.

### Sessile amoebae

Biofilms were poorly colonized by amoebae before the treatments were started (10 to 50 cysts/cm<sup>2</sup>). No clear trends in amoeba population concentrations were observed during the studies and amoebae were still present in the biofilms of all loops at the end of the treatment period (0.1 to 30 cysts/cm<sup>2</sup>).



**Figure 2 :** Changes in planktonic *Legionella* populations within recirculation loops during treatments (values shown at 100 CFU/L were lower than the detection limit of 500 CFU/L).



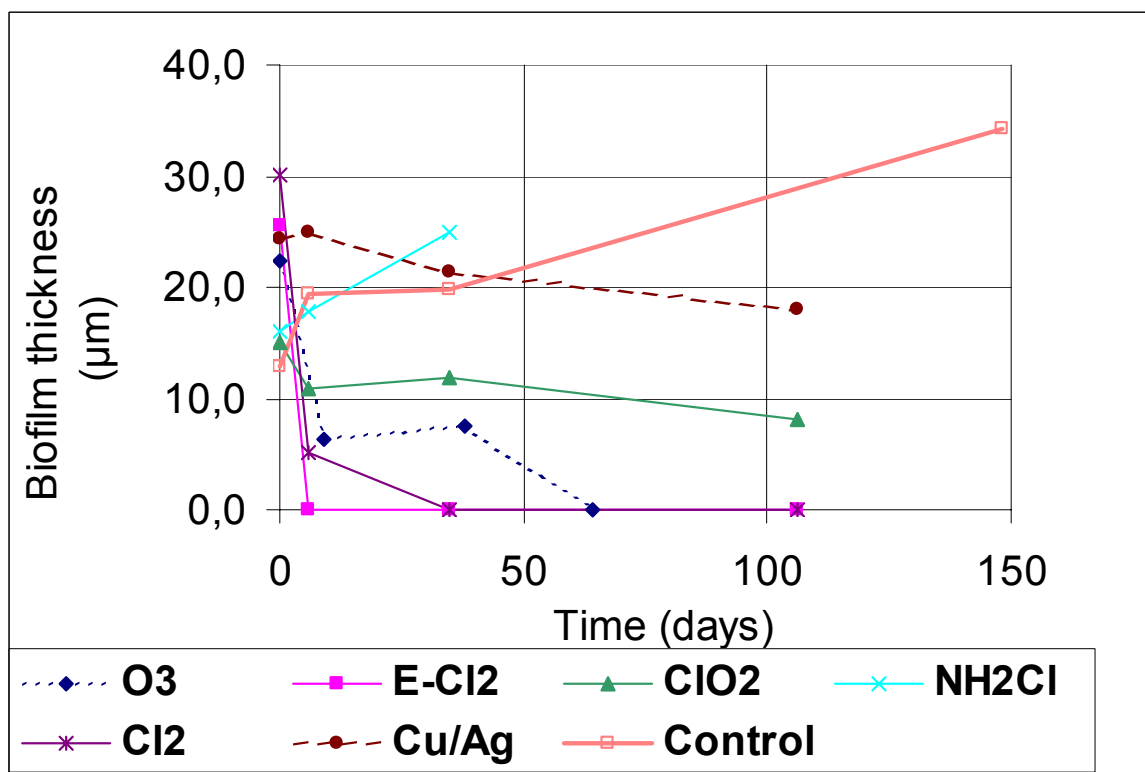
**Figure 3 :** Changes in sessile *Legionella* populations in recirculation loops during treatments.

Amoebae (MPN/L)	Ozone	Chlorine dioxide	Chlorine	Electro chlorination	Mono chloramine	Copper / silver
log (initial population)	4,2	3,5	4,2	4,2	4,0	2,9
log (final population)	0,6	1,7	1,4	1,7	3,5	2,6
log (reduction)	3,6	1,8	2,8	2,5	0,5	0,3

**Table 2 :** Changes in planktonic amoebae populations in recirculation loops during treatments.

### Biofilm thickness

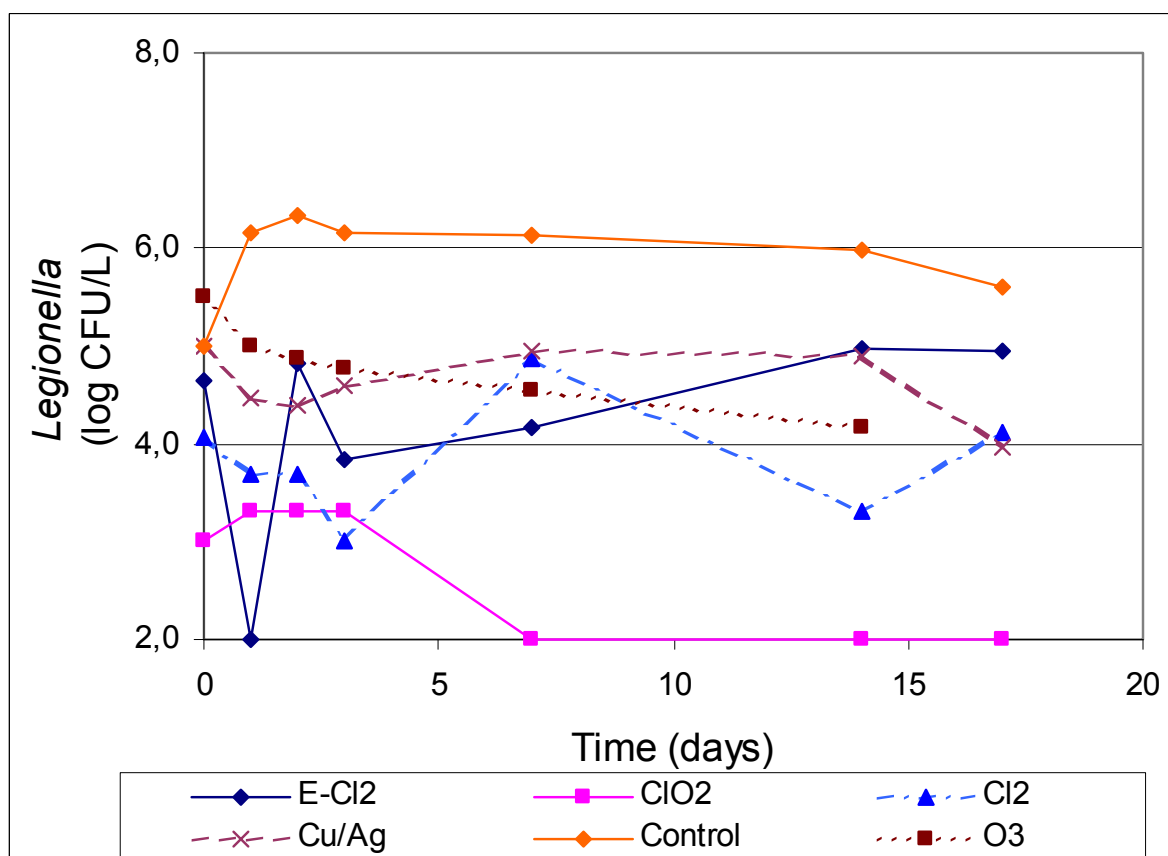
Biofilm thickness in the control (untreated) loop increased during the studies from 13  $\mu\text{m}$  to about 35  $\mu\text{m}$ . This same trend was observed in the loop treated with monochloramine. Copper/silver had no effect on biofilm thickness while chlorine dioxide reduced it significantly. Ozone, electro-chlorination and chlorine treatments resulted in biofilm thickness below detection limits ( $< 5\mu\text{m}$ ).



**Figure 4** : Changes in biofilm thickness in recirculation loops during treatments (values shown at 0 µm were lower than the detection limit of 5 µm).

### Dead legs

As long as the water renewal rate was maintained at 20% per day, no significant change of the planktonic and biofilm populations was observed in the dead legs. Using this flushing protocol, microbial contamination of the dead legs remained high. 24 hours after application of a single complete flushing of the dead legs with treated water from the loops, all dead legs recovered their initial contamination levels. After seven days of applying a flushing program consisting of totally discharging the loop volumes through the dead legs every day, *Legionella* became undetectable in the water (figure 5) and the biofilm of the dead leg receiving chlorine dioxide. No change in the planktonic nor sessile microbial populations was observed in the other dead legs.



**Figure 5:** Changes in planktonic *Legionella* populations in dead legs during treatments (values shown at 100 CFU/L were lower than the detection limit of 500 CFU/L).

### Corrosion

Following exposure of the mild and galvanized steel coupons installed in the loops to the various treatments, the coupons had visible corrosion marks on their inner surface. Coupons exposed to monochloramine also showed similar marks, although the contact time was only one month in that case. However, no difference in aspect nor loss of weight was noticeable between the coupons from the control loop and the others, except for those in contact with copper/silver. The coupons exposed to copper/silver were covered by copper deposits.

Copper deposits are known to initiate pitting corrosion on steel, via a galvanic corrosion mechanism. Although pitting corrosion was not observed during the study



period, intense corrosion was observed once the study was complete on the loop treated with copper/silver, in the absence of continued chemical treatment.

No corrosion mark nor weight loss was observed on the copper and brass coupons installed in the dead legs.

### ***Disinfection by-products***

The disinfection by-products (DBP) concentrations found in the loops were compared to the maximum levels required by the regulations currently in force in Europe for drinking water. In comparison to the regulatory limits, DBP were found in excess with the following treatments:

- Chlorine dioxide: chlorite > 0.2 mg/L
- Chlorine : THM > 100 µg/L
- Electro-chlorination: THM > 100 µg/L, bromate > 10 µg/L
- Ozone: bromate > 10 µg/L

## **CONCLUSIONS**

Domestic water distribution systems are known reservoirs of microbial contamination, including biofilms, protozoa, and opportunistic pathogens such as *Legionella*. Even in the presence of disinfectant residuals, microorganisms may proliferate in these systems, resulting in exposure of the system users to infectious organisms. Many epidemiological studies have identified domestic water systems as the cause of waterborne disease.

Although *in vitro* experiments have validated the efficacy of all antimicrobials commonly used in domestic water systems, the extrapolation of this laboratory data to real-world applications is problematic (Campos 2003). This is revealed in the sometimes dramatic differences observed for laboratory-derived disinfectant efficacy data compared to actual efficacy observed in water systems.

Similarly, comparing disinfectant efficacy in real-world applications is difficult given the number of factors that influence microbial growth and system fouling. Factors that influence the potential for microbial proliferation in domestic water systems include

water temperature, the age of water tanks and associated distribution pipework, materials of plumbing construction, system hydrodynamics, the chemical constituents of the water itself, and the diversity of microbial flora present.

Increasingly, water system owners, operators, and users require scientific data to aid in the selection of domestic water distribution system treatment programs. The disinfectant efficacy data obtained from *in vitro* tests and real-world applications is very important and should not be underestimated. However, additional data that compares treatment efficacy under controlled, yet realistic conditions would be helpful.

The domestic water supply simulation unit developed for this study allowed simulation of the conditions that exist in building domestic (potable) water systems. The fouling procedure applied to the system led to the establishment of stable biofilm, *Legionella* and amoebae populations in each of the seven rigs composing the pilot unit. Once these populations were established, the system was used for comparative assessment of treatment efficiency and operation, in equivalent conditions of system design, materials of construction, hydraulics, water quality, temperature, and initial fouling. Treatment efficiency was assessed not only on *Legionella*, but also on amoebae and biofilms, which contribute to the establishment and dissemination of these bacteria in water systems, and their resistance to treatments.

Chlorine dioxide and chlorine (as bleach or obtained by electro-chlorination) were the most effective treatments in this study. This was revealed in the ability of chlorine and chlorine dioxide to reduce *Legionella* contamination in the water and the biofilm of the recirculating loops, and to maintain *Legionella* concentrations below analytical detection limits throughout the study. Chlorine dioxide showed less ability than chlorine to remove the biofilm. However, this difference in biofilm removal could have been due to differences in the concentrations applied (0.5 mg/L for chlorine dioxide versus 2.5 mg/L for chlorine).

Compared to chlorine, chlorine dioxide showed a longer residual activity in the system, leading to improved performance in the dead leg. Chlorine dioxide was the only disinfectant able to reduce dead leg *Legionella* concentrations below detection once the flushing protocol began.

However, when a single flushing was applied, it was followed by the re-colonization of the dead leg within 24 hours. Consequently on real systems, flushing dead legs with disinfected water once a day appears to be a minimum recommendation. In actual systems, this flushing may be achieved by making outlet flushing part of the normal routine for housekeeping and maintenance functions. Ideally, outlets and associated pipework that are rarely used and not required should be removed or isolated.

This observed importance of flushing also shows that controlling the microbial contamination requires a constant maintenance of a disinfectant residual throughout the water system. While “slug” or “shock” disinfectant doses may be effective at controlling growth in the short-term or as an emergency decontamination protocol, long-term control requires continuous disinfectant application and flushing to ensure that effective disinfectant concentrations are circulated throughout the system.

In this study, chlorine dioxide dosage control was achieved using an amperometric sensor, which offered accurate and reliable control. Redox potential sensors (not evaluated in these studies) can also be used for chlorine dioxide, but report only a millivolt (mv) value and not a chlorine dioxide concentration (mg/L). Since disinfectant dosing and exposure limits are typically expressed as concentrations, the amperometric control device may have greater utility to system operators. In contrast to the chlorine dioxide sensor, the total chlorine amperometric sensors used within this study required heavy maintenance (membrane replacement and calibration every 48 hours), probably because of a quick fouling of their membrane. Such sensors were not robust enough for on-site application. Alternative solutions such as redox potential or colorimetric sensors (although not tested in these studies) are preferred for chlorine dosage control.

Ozone at 0.5 mg/L had an effect throughout the entire recirculation loop against planktonic and biofilm populations, even in the absence of detectable residual after the contact column. This result was surprising, but could be explained by the presence in the loop system water of an ozone residual below detection limits. Ozone achieved the greatest amoebae reduction in the recirculation loop and appears therefore to be a promising technology for *Legionella* control. As with the other treatments, other than chlorine dioxide, ozone was ineffective at reducing *Legionella*

contamination within dead legs. Further studies would be useful to optimize its dosage and achieve better control of *Legionella* and amoebae. Field studies are also required to assess the feasibility of this technology on real domestic water systems, where pipework systems may be more extensive.

Monochloramine was effective against planktonic and sessile *Legionella*, but showed no effect against amoebae, and no capacity to remove the biofilm. However, the protocol used for monochloramine preparation did not allow maintenance of a stable product. This resulted in insufficient dosing in the recirculation loop (0.5 mg/L instead of the targeted 2 mg/L).

The lack of commercially available product or generator for this chemical is a serious obstacle to its potential use for *Legionella* control in domestic water systems. Alternatively, a separate injection of ammonia and chlorine, leading to the formation of monochloramine within the system, could be envisaged, but the feasibility and performance of such a mode of preparation still has to be demonstrated.

Copper/silver over-dosage (0.75 mg/L of copper, for a target at 0.5 mg/L) could be due to the fact that the generator was over-sized for the pilot loop (up to 15 m<sup>3</sup>/h capacity, for a flow of 200 L/h). However, despite the over-dose applied, copper/silver showed poor efficiency on all of the parameters tested. Copper/silver initially reduced planktonic *Legionella* concentrations to below the detection limit, but failed thereafter to control the contamination. Consequently in water systems where such disinfection method is applied, *Legionella* testing should be continuously performed to detect any drift in disinfection efficiency. Additionally, copper/silver led to a red staining of the water, formation of sludge in the loop, and copper deposits on the pipes. This could be explained by the fact that copper was mainly in the form of suspended particles. This hypothesis is supported by a recent study showing that copper is able to form insoluble complexes at pH values above 6.0 (Lin 2002). According to this study, 90% of the copper should have been present as insoluble complexes in the pilot unit, because of the pH of the water (pH = 7.6). The same study concluded that silver solubility is not influenced by the pH, but is affected by the presence of chloride ions. Hence, 60% of the silver should have been in a precipitate form in the pilot unit, because of the chloride content of the water (32 mg/L). For these reasons, the real

concentration of copper and silver, available in an active form in the loop, remained unknown.

All treatments generated corrosion on mild and galvanized steel. This result was not surprising, as each of the disinfectants evaluated in this study are known to cause corrosion. The relatively short duration of this study, compared to operation of an actual building water system, did not allow for significant corrosion rate data collection. However, the fact that each of the treatments can cause corrosion highlights the need for consistent dosage control at concentrations that reduce microbial fouling, yet minimize the impact on corrosion. In this regard, disinfectants that are effective at low concentrations may be favored.

Additionally, copper/silver generated copper deposits which can initiate pitting corrosion on steel. Pitting corrosion however was not observed on the pipes, probably because the duration of the study was insufficient to observe such phenomenon. Nevertheless, the intense corrosion within the copper/silver treated loop that was observed upon study completion suggests that this treatment may lead to corrosion in some circumstances. This corrosion is most probably galvanic. Therefore, mild steel or galvanized systems treated using copper/silver ionization should be monitored closely for copper deposition and corrosion.

Disinfection by-products (DBP) were found in excess in the loops treated with chlorine dioxide, chlorine, electro-chlorination and ozone. However, DBP formation is system dependent, and the results observed in this study do not mean that excessive DBP concentrations will be necessarily generated in all systems submitted to such treatments. Indeed, these disinfectants have been successfully applied to domestic water systems without exceeding DBP limits. Nevertheless, the fact that some DBP limits were exceeded in this study signifies that attention must be paid to DBP. This may be particularly important in cases of water systems presenting high oxidant demand (*i.e.* highly fouled, composed of new materials, with no protective scale deposits nor anti-corrosion treatment), and high retention time of the water in the system (*i.e.* with high storage volumes or low use rates), as simulated in this study.

## REFERENCES

- Botzenhart, K., J. Bartram, et al. (2002). Legionella. Guidelines for drinking water quality. Second edition. Addendum. Microbial agents in drinking water. WHO (World Health Organization): 40-69.
- Campos, C., J. F. Loret, et al. (2003). "Disinfection of domestic water systems for Legionella pneumophila." Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA **52**(5): 341-354.
- ISO 7393-2 (2000). Water quality – Determination of free chlorine and total chlorine. Part 2: Colorimetric method using N, N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes.
- ISO 10301 (1997). Water quality – Determination of highly volatile halogenated hydrocarbons – Gas chromatographic methods.
- ISO 11731 (1998). Water quality - Detection and enumeration of Legionella.
- ISO 15061 (2001). Water quality – Determination of dissolved bromate – Method by liquid chromatography of ions.
- Kim, B. R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., Kendall, A.M. (2002). "Literature review - efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems." Water Research **36**: 4433-4444.
- Lin, Y. E., Vidic, R. D., Stout, J. E., Yu, V. L. (2002). "Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling Legionella pneumophila." App. Environ. Microbiol **68**(6): 2711-2715.
- Muraca, P. W., J. E. Stout, et al. (1987). "Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV radiation light for killing Legionella pneumophila within a model plumbing system." Applied and Environmental Microbiology **53**(2): 447-453.
- Pavey, N. L. (1996). Ionisation water treatment for hot and cold water services. Bracknell, Berkshire, The building services research and information association: 1-65.
- Pavey, N. L. and M. Roper (1998). Chlorine dioxide water treatment for hot and cold water services. Bracknell, Berkshire, UK, The building Services Research and Information Association: 1-50.
- Pernin, P., M. Pélandakis, et al. (1998). "Comparative recoveries of Naegleria fowleri amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation." App. Environ. Microbiol **64**(3): 955-959.
- USEPA Method 300.1(1997). Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography, Revision 1.0, EPA/600/R-98/118
- White, G., C. (1999). Handbook of chlorination and alternative disinfectants, Wiley-Interscience Publications: 228.