



E
D J

► **To cite this version:**

| D J. E. Ecologie, Environnement. U, 2012. Français. NNT: . tel-00922431

HAL Id: tel-00922431
<https://theses.hal.science/tel-00922431>

Submitted on 26 Dec 2013

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

**ÉCOLE DOCTORALE : ABIES (AGRICULTURE, ALIMENTATION, BIOLOGIE,
ENVIRONNEMENT, SANTE)**

LABORATOIRE : Institut de Génétique et de Microbiologie - UMR 8621 CNRS

DISCIPLINE : Science de l'environnement

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

soutenue le 20 Décembre 2012

par

Delphine JAKUBEK

ÉCOLOGIE DES LEGIONELLES DANS L'EAU DES CIRCUITS DE REFROIDISSEMENT DES CENTRALES NUCLEAIRES EN BORD DE LOIRE

**Directeur de thèse : Michael DUBOW - Professeur (Université Paris-Sud - Institut de Génétique et
Microbiologie)**

Composition du jury :

<i>Président du jury :</i>	Stéphan JACQUET	Directeur de Recherche (INRA de Thonon-les-Bains)
<i>Rapporteurs :</i>	Philippe LEBARON	Directeur de Recherche (Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer)
	Laurence MATHIEU	Maître de Conférences HDR (Ecole Pratique des Hautes Etudes)
<i>Examineurs :</i>	Julia BAUDART	Maître de Conférences (Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer)
	Josselin BODILIS	Maître de Conférences HDR (Laboratoire de Microbiologie Environnementale et Biologie Evolutive)
	Armel GUYONVARCH	Professeur (Institut de Génétique et Microbiologie)
<i>Membres invités :</i>	Marie BINET	Ingénieur de Recherche (EDF R&D de Chatou)
	Matthieu LE BRUN	Ingénieur de Recherche (EDF R&D de Chatou)
	Gérard LEBLON	Professeur en retraite

« [...] l'imagination, livrée à ses seules forces, s'est toujours montrée incapable d'envisager les dimensions de la réalité telles qu'elles se manifestent à la science, c'est-à-dire infiniment plus complexes, plus gigantesques, et même plus merveilleuses que nous ne pouvions les imaginer. »

Jean Onimus (1909 – 2007)

AVANT PROPOS

Cette thèse est le résultat d'un partenariat entre l'Institut de Génétique et Microbiologie (CNRS UMR 8621, Université Paris-Sud) et le Laboratoire National Hydraulique et Environnement du département Recherche & Développement d'EDF. Cette thèse a été encadrée, à l'université par les professeurs MICHAEL DUBOW et GERARD LEBLON, et en entreprise par les ingénieurs chercheurs MARIE BINET et MATTHIEU LE BRUN.

Cette thèse a été co-financée par EDF et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) au travers d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE n° 20/2009).

REMERCIEMENTS

Arrivée au terme de cette aventure qu'on appelle le doctorat, je tiens à remercier l'ensemble des personnes que j'associerais tout naturellement au souvenir de cette thèse. Que ce soit sur le plan scientifique ou non, mon entourage professionnel et personnel ont été (intentionnellement ou non) des acteurs engagés dans ce challenge que je me suis lancé il y a maintenant 3 ans, 11 mois et 6 jours !!!

Je voudrais remercier tout d'abord les personnes sans qui cette thèse n'aurait pas pu voir le jour et qui ont contribué au financement de mon projet: l'ancien et l'actuel chef de département du LNHE, Laurent Perotin ainsi que Jean Daniel Mattéi ; l'actuel chef de département délégué, Hubert Dupin ; l'ancien et l'actuelle chef de groupe P77 dans lequel s'est inscrit ma thèse, Nicolas Tousset et Anne-Lise Brasseur.

Je remercie également les membres du jury, Philippe Lebaron et Laurence Mathieu qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail et d'en être rapporteur, ainsi que Julia Baudart, Josselin Bodilis et Stéphan Jacquet d'avoir accepter de faire parti de mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mes directeurs de thèse à l'université Paris-sud, Michael Dubow et Gérard Leblon qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse, par leur regard extérieur à l'entreprise et leur appui scientifique notamment concernant la publication des articles scientifiques. Je les remercie particulièrement pour le soutien qu'ils m'ont apporté au sein de l'université et pour avoir gérer et faciliter mes relations avec celle-ci.

C'est avec une touche d'émotion que j'exprime maintenant ma profonde gratitude aux personnes qui ont vécu quotidiennement cette thèse à mes côtés.

Je tiens en tout premier lieu à remercier Marie Binet, ingénieur chercheur au sein du département LNHE d'EDF R&D qui m'a encadré pendant cette thèse, et plus encore... En effet, Marie me suit depuis mon stage de Master pendant lequel j'ai pu découvrir le monde passionnant de la microbiologie associée à la recherche industrielle. Depuis ce temps, Marie m'a pleinement montré la confiance qu'elle me portait et m'a, par la suite, proposé, sans que je m'y attende, de réaliser une thèse CIFRE sur l'écologie des légionelles dans les centrales nucléaires. Après mûre réflexion, c'est avec plaisir mais non sans appréhension que j'accepte ce défi...

Dirigée pendant cette thèse par Marie et son confrère Matthieu Le Brun, deux caractères bien différents mais oh combien complémentaires, j'évolue tant sur le plan scientifique que personnel.

Au côté de Marie, de part ses compétences scientifiques et sa qualité de chef de projet, j'apprends à murir mes réflexions et à concevoir la complexe stratégie d'une entreprise d'échelle internationale. Elle fait preuve d'une combativité féroce pour défendre mon projet auprès des détracteurs et des « frileux » et a su m'ouvrir ses bras plus d'une fois quand je me suis confrontée aux durs échecs de la vie d'un chercheur.

Auprès de Matthieu, j'ai partagé de longues heures de réflexion et de débat scientifique toujours dans la bonne humeur et la détente, mêlant rigueur et réconfort. Son expérience de terrain, dont il consacre l'essentiel de son activité aujourd'hui, m'ont été d'une aide

précieuse. Très bon pédagogue, Matthieu m'a transmis bon nombre de connaissances concernant les problématiques industrielles d'EDF et les études réalisées précédemment par la R&D. De Matthieu, je me rappellerai son humanisme et ses paroles encourageantes toujours tombées à point nommé, et n'oublierai certainement pas mon si charmant surnom « Toutoune », dont l'origine m'est mystérieuse.

Je tiens également à exprimer mon profond remerciement à Carole Guillaume, ingénieur chercheur à Euro-Engineering, qui, outre le temps passé sur un travail commun, m'a fait bénéficier de son expérience passée du doctorat et a accordé une écoute attentive aux nombreux tourments du thésard. Face à mes doutes, elle a su trouver les mots pour me redonner confiance et retrouver du courage. Son soutien a largement contribué à me rendre plus sereine lors de cette thèse.

Je remercie particulièrement Emilie Leherciey et Gaëlle Le Meur, deux techniciennes de talent pour m'avoir accompagné dans mes déplacements sur la Loire. Que ce soit sous la pluie ou au contraire sous le soleil, c'est toujours avec le sourire, et sans rechigner sur les horaires, qu'elles me suivaient pour faire la tournée des centrales. Elles n'ont pas non plus été épargnées une fois revenues des campagnes... Leur aide a été plus que précieuse pour la réalisation des expériences en laboratoires, dont la quantité aurait pu en effrayer plus d'un !!!

Une pensée particulière pour mes collègues thésards avec qui j'ai partagé mon bureau et bien d'autres choses...

Je remercie également toutes les personnes qui se sont intéressées à mon travail, notamment l'équipe microbiologie du LNHE ainsi que toutes celles qui ont contribué à la bonne humeur que j'ai partagée pendant ces années de thèse.

Je réserve la fin de ces remerciements à mon entourage personnel qui ont cru en mes capacités du début à la fin et m'ont apporté leur soutien inconditionnel : mes parents, Claude, Jack, mes sœurs et bien sûr celui qui partage aujourd'hui ma vie et qui a subi quotidiennement les aléas de mon moral, Mathieu... De tout cœur, Merci !!!

SOMMAIRE

AVANT PROPOS.....	5
REMERCIEMENTS	7
SOMMAIRE	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLES	16
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	23
1. INTRODUCTION.....	25
2. <i>LEGIONELLA</i>	26
2.1. <i>Historique</i>	26
2.2. <i>Infections à Legionella</i>	26
2.3. <i>Réglementation</i>	29
2.4. <i>Taxonomie</i>	31
2.5. <i>Caractères biochimiques généraux</i>	31
3. TYPAGE DES LEGIONELLES	34
3.1. <i>Taxonomie et phylogénie bactérienne</i>	34
3.2. <i>Principe de l'identification des légionelles pour le suivi épidémiologique</i>	38
3.3. <i>Méthodes d'identification taxonomique pour des études d'écologie microbienne</i>	39
3.4. <i>Conclusions</i>	52
4. ECOLOGIE DES LEGIONELLES	53
4.1. <i>Mode de vie planctonique et sessile</i>	54
4.2. <i>Habitats aquatiques</i>	60
4.3. <i>Interactions abiotiques et biotiques des légionelles avec leur environnement</i>	62
4.4. <i>Notion de réseau trophique</i>	69
5. ECOLOGIE ET RÉPONSE DES LEGIONELLES EN PRÉSENCE DE BIOCIDES CHLORÉS.....	74
5.1. <i>Les différents procédés de désinfection des réseaux et leur mode d'action sur les micro-organismes</i>	74
5.2. <i>Efficacité des biocides chlorés sur les micro-organismes</i>	85
5.3. <i>Réponse cellulaire des micro-organismes aux biocides</i>	89
5.4. <i>Réponse écosystémique aux biocides</i>	96
5.5. <i>Conclusions</i>	98
CHAPITRE 2 : ECOLOGIE DES LEGIONELLES DANS L'EAU DES CIRCUITS DE REFROIDISSEMENT DES CENTRALES NUCLEAIRES EN BORD DE LOIRE	100
INTRODUCTION	102
1. <i>Contexte industriel</i>	102
2. <i>Objectifs</i>	103
3. <i>Sites d'études</i>	104
4. <i>Méthodologie</i>	104
ARTICLE 1: VALIDATION OF IRS PCR, A MOLECULAR TYPING METHOD, FOR THE STUDY OF THE DIVERSITY AND POPULATION DYNAMICS OF LEGIONELLA IN INDUSTRIAL COOLING CIRCUITS	106
DELPHINE JAKUBEK, MATTHIEU LE BRUN, GERARD LEBLON, MICHAEL DUBOW, MARIE BINET	106
LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, DOI: 10.1111/LAM12025	106
ARTICLE 2: TEMPORAL DYNAMICS OF LEGIONELLA PNEUMOPHILA SUBPOPULATIONS IN NUCLEAR POWER PLANT COOLING CIRCUITS LOCATED ON THE RIVER LOIRE	122
DELPHINE JAKUBEK, MATTHIEU LE BRUN, GERARD LEBLON, MICHAEL DUBOW, MARIE BINET	122
SOUMIS POUR PUBLICATION, AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY	122

ARTICLE 3: DIFFERENT SPATIO-TEMPORAL DYNAMICS OF LEGIONELLA PNEUMOPHILA SUBPOPULATIONS IN NUCLEAR POWER PLANT COOLING CIRCUITS.....	152
DELPHINE JAKUBEK, MATTHIEU LE BRUN, GERARD LEBLON, MICHAEL DUBOW, MARIE BINET	152
SOU MIS POUR PUBLICATION, <i>AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY</i>	152
ARTICLE 4: THE IMPACT OF MONOCHLORAMINE ON THE DIVERSITY AND DYNAMICS OF LEGIONELLA PNEUMOPHILA SUBPOPULATIONS IN A NUCLEAR POWER PLANT COOLING CIRCUIT	178
DELPHINE JAKUBEK, MATTHIEU LE BRUN, GERARD LEBLON, MICHAEL DUBOW, MARIE BINET	178
SOU MIS POUR PUBLICATION, <i>FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY</i>	178
ARTICLE 5: SUSCEPTIBILITY OF LEGIONELLA STRAINS TO THE CHLORINATED BIOCID E, MONOCHLORAMINE	202
DELPHINE JAKUBEK, CAROLE GUILLAUME, MARIE BINET, GERARD LEBLON, MICHAEL DUBOW, MATTHIEU LE BRUN....	202
SOU MIS POUR PUBLICATION, <i>MICROBES AND ENVIRONMENTS</i>	202
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	230
1. DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DES COMMUNAUTES DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> CULTIVABLES	232
2. REGULATION DE LA CONCENTRATION EN LEGIONELLES	235
3. ECOLOGIE DES LEGIONELLES EN PRESENCE DE MONOCHLORAMINE ET SENSIBILITE CELLULAIRE AU BIOCID E	237
4. PERSPECTIVES GENERALES.....	239
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	242
ANNEXES.....	266

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE	Abundance-based Coverage Estimator
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragments Length Polymorphism
AGR	Agence Régionale de Santé
AP PCR	Arbitrarily Primed PCR
ARN	Acide Ribonucléique
ARS	Agence Régionale de Santé
ASN	Autorité de Sureté Nucléaire
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BLS	Bacteriocin Like Substance
CDB	Convention sur la Diversité Biologique
CE-SSCP	Capillary Electrophoresis SSCP
CCLIN	Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales
CLIN	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CIRE	Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie
CME	Conseil Mondial de l'Eau
CNPE	Centres Nucléaires de Production d'Electricité
CNRL	Centre National de Référence des Légionelles
CRF	Circuit de Refroidissement
CSHPF	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
DARPE	Demande d'Autorisation de Rejet et de Prise d'Eau
DGS	Direction Générale de la Santé
DGSNR	Direction Générale de la Sureté Nucléaire et de la Radioprotection
DO	Déclaration Obligatoire
DPPR	Direction de la Prévention, des Pollutions et des Risques
DRT	Direction des Relations au Travail
ECDC	European Center for Disease prevention and Control
EDF	Electricité De France
ELDSNet	European Legionnaires's Disease Surveillance Network
EPS	Exopolysaccharide
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	EUropean Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
EWGLI	European Working Group for <i>Legionella</i> Infections
EWGLINet	EWGLI Network
FAME	Fatty Acids Methyl Ester
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GSH	Glutathion
GVPC	Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide
HPA	Health Protection Agency
ICPE	Installation Classée Pour l'Environnement
ICSB	International Committee on Systematic Bacteriology
IFD	ImmunoFluorescence Directe
INB	Installation Nucléaire de Base
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IRS PCR	Infrequent Restriction Site PCR
ISR	Intergenic Spacer Region
ITS	Intergenic Transcribed Spacers
IWA	International Water Association

LLAP	<i>Legionella</i> –Like Amoebal Pathogen
LPS	Lipopolysaccharide
MAbs	Monoclonal Antibodies
MBC	Minimal Bacteriostatic Concentration
MES	Matières En Suspension
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MIF	Mature Intracellular Form
MLVA	Multiple-Locus VNTR Analysis
MRA PFGE	Macro Restriction Analysis PFGE
nMDS	nonmetric MultiDimensional Scaling
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONG	Organisation Non Gouvernementale
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PLFA	PhosphoLipid Fatty Acids
QAC	Quaternary Ammonium Compound
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
REP	Réacteur à Eau Pressurisée
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	Reactive Oxygen Species
RSE	Responsabilité Sociale des Entreprises
SIN	Signalement des Infections Nosocomiales
SBT	Sequence Based Typing
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SOD	Superoxyde Dismutase
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TAR	Tour Aéroréfrigérante
TESSy	The European Surveillance Sytem
THM	Trihalométhane
TNT	Trinitrotoluène
TSN	Transparence et Sécurité en matière Nucléaire
UFC	Unité Formant Colonie
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
USEPA	United State Environmental Protection Agency
UV	Ultra Violet
VBNC	Viable But Non Cultivable
VNTR	Variable-Number Tandem Repeat
WHO	World Health Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1: <i>L. pneumophila</i> , microscopie électronique à transmission recolorisée (d'après Fraser, 2005).....	26
Figure 1-2: Cycle de vie schématisé de <i>L. pneumophila</i> dans les macrophages (d'après Swanson et Hammer, 2000).....	27
Figure 1-3: Modèle conceptuel d'exposition au germe <i>Legionella</i> à partir de l'inhalation d'aérosols provenant de douche contenant des légionelles (d'après Schoen et Ashbolt, 2011).....	27
Figure 1-4: Evolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose en France, 1988-2010 (d'après Campese <i>et al.</i> , 2011b).....	28
Figure 1-5: Rang taxonomique. Exemple de la légionelle.	34
Figure 1-6: Gènes ribosomiaux codant pour les ARNr 23S, 16S et 5S chez <i>Escherichia coli</i>	36
Figure 1-7: Structure de l'ARNr 16S des bactéries qui présente neuf régions variables (V1 à V9) entourées de régions hautement conservées.	36
Figure 1-8: Sélection de la méthode appropriée pour le typage des souches bactériennes (d'après Wenjun <i>et al.</i> , 2009).....	37
Figure 1-9: Résolution taxonomique de différentes méthodes dont certaines utilisées pour le typage des légionelles (d'après Vandamme <i>et al.</i> , 1996).	39
Figure 1-10: Ensemble des méthodes utilisées en écologie ainsi qu'en épidémiologie pour l'identification des espèces et des souches de légionelles.	40
Figure 1-11: Principe des essais d'hybridation ADN-ADN (d'après Rossello-Mora et Amann, 2001).	44
Figure 1-12: Infection d' <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (en haut) et d'un macrophage (en bas) par <i>L. pneumophila</i> en microscopie électronique à transmission (d'après Molmeret <i>et al.</i> , 2004).....	54
Figure 1-13: Cycle de vie de <i>L. pneumophila</i> (d'après Molofsky et Swanson, 2004).	55
Figure 1-14: Rôle des biofilms en tant que réservoir de micro-organismes pathogènes et source de contamination de systèmes de distribution d'eau (d'après Wingender et Flemming, 2011).	57
Figure 1-15: Modèle de propagation des légionelles dans un système de distribution d'eau potable (d'après Lau et Ashbolt, 2009).	59
Figure 1-16: Représentation schématisée des diverses composantes de l'écologie des légionelles dans les systèmes de distribution d'eaux (d'après Levi, 2001).	62
Figure 1-17: Phages de <i>Legionella</i> observés en microscopie électronique à transmission, grossissement x 110000 (d'après Lammertyn <i>et al.</i> , 2008).	67
Figure 1-18: Différents types d'interactions directes et indirectes possibles entre deux individus (d'après Morin, 2011).....	69
Figure 1-19: Cycle de la matière et compartiments biologiques d'un écosystème aquatique.	71
Figure 1-20: Boucle virale et microbienne (d'après Fuhrman, 1999).....	73
Figure 1-21: Propriétés phénotypiques des bactéries aquatiques capables d'échapper à la prédation (d'après Pernthaler, 2005).....	73
Figure 1-22: Dommages de l'ADN produits par les UV (d'après USEPA, 1999).....	75
Figure 1-23: Mécanismes d'inactivation de différents micro-organismes par les biocides (d'après Doyle <i>et al.</i> , 2006).....	77
Figure 1-24: Les espèces réactives de l'oxygène et leur système de détoxification.	78
Figure 1-25: Modification de quelques acides aminés par attaque radicalaire (d'après Mogoa, 2010).....	80
Figure 1-26: Mécanisme en chaîne de la peroxydation lipidique et nature des produits formés (d'après Favier, 2003).....	81
Figure 1-27: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (d'après Favier, 2003).....	81
Figure 1-28: Formation des chloramines en fonction du pH (d'après Palin, 1950).....	84
Figure 1-29: Courbes représentatives de l'effet des antibiotiques sur des souches bactériennes résistantes, tolérantes et sensibles (d'après Atkinson <i>et al.</i> , 2000).....	85
Figure 1-30: Effet de la concentration en agent antibactérien sur des micro-organismes sessiles et planctoniques. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (MIC et MBC) (d'après Harrison <i>et al.</i> , 2007a).	86
Figure 1-31: Schéma général des différents mécanismes de lutte des bactéries contre les agents antibactériens (d'après Doyle <i>et al.</i> , 2006).....	89

Figure 1-32: Classification des micro-organismes selon leur sensibilité aux biocides : du moins sensible (-) au plus sensible (+) (d'après Tumah, 2009).	90
Figure 1-33: Représentation schématique des différentes réponses d'une communauté microbienne et de leurs conséquences fonctionnelles face à une perturbation environnementale (d'après Allison et Martiny, 2008).	96
Figure 2-36 : Dendrogramme non enraciné des types de <i>L. pneumophila</i> et <i>L. spp.</i> identifiés par IRS PCR	120
Figure 2-37 : Dendrogrammes issus du séquençage de l'ADNr 16S, à gauche et du typage par IRS PCR, à droite	121
Figure 2-38 : Schéma général simplifié des différentes voies d'interaction entre les facteurs abiotiques et biotiques, utilisés pour la recherche de liens entre les communautés de légionelles et leur environnement.	124
Figure 2-39: Localisation des sites de l'étude sur la Loire (site L) et sur la Moselle (site M).	143
Figure 2-40: Point de prélèvement localisé dans le bassin froid des circuits de refroidissement des centrales thermiques.	143
Figure 2-41: Courbes de rarefaction des sous-populations de <i>Legionella pneumophila</i> cultivables originaires du site M, identifiées par typage IRS PCR.	144
Figure 2-42: nMDS (Stress de Kruskal = 0.1586), basée sur l'indice de Bray Curtis, analysant la composition des communautés de <i>Legionella pneumophila</i> isolées pendant un an des circuits de refroidissement (tranche 1 et 2) de la centrale thermique du site L.	144
Figure 2-43: Biplot d'analyse ACP des sous populations cultivables de <i>Legionella pneumophila</i> identifiées par IRS PCR en fonction de leur période d'isolation.	145
Figure 2-44: Abondance relative des sous-populations d'intérêt, liées avec le caractère saisonnier de la composition des communautés.	146
Figure 2-45: Relation entre la concentration en <i>Legionella pneumophila</i> cultivables et différents paramètres présentant un coefficient de corrélation de Pearson significatif.	147
Figure 2-46: Représentation schématique des liens significatifs directs et indirects existant entre la concentration en <i>Legionella pneumophila</i> cultivables et les facteurs biotiques et abiotiques mesurés.	148
Figure 2-47 : Sous-populations détectées dans les CRF du CNPE de Dampierre.	149
Figure 2-48 : Structure de la communauté de <i>L. pneumophila</i> dans le CRF du CNPE de Dampierre et mécanismes hypothétiques de régulation de cette communauté.	150
Figure 2-49 : Mécanismes de régulation hypothétiques de la concentration en <i>L. pneumophila</i> par les paramètres environnementaux mesurés dans le CNPE de Dampierre.	151
Figure 2-50 : Localisation des sites de l'étude basés sur la Loire.	170
Figure 2-51: Concentrations en <i>Legionella pneumophila</i> , déterminées par la méthode culturale, relevées dans les différentes tranches des 4 sites.	171
Figure 2-52: Diagramme de Venn représentant la distribution spatiale des sous populations de <i>Legionella pneumophila</i> détectées dans les circuits de refroidissement des 4 sites étudiés ainsi que dans la rivière.	172
Figure 2-53: Distribution des sérogroupes des isolats de <i>Legionella pneumophila</i> issus des 4 sites étudiés en fonction de la distance à partir de la source.	172
Figure 2-54: Analyse de la composition des communautés de <i>Legionella pneumophila</i> dans les différents sites et à différentes périodes de l'année par approche nMDS basé sur l'indice de Bray Curtis (stress de Kruskal = 0.1974).	173
Figure 2-55: Graphique radar représentant les valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les concentrations en <i>Legionella pneumophila</i> cultivables, relevées pour chacun des sites, et différents facteurs environnementaux.	174
Figure 2-56: Diagramme de classification hiérarchique construit par l'algorithme de Ward et les distances euclidiennes basées sur les valeurs des coefficients de Pearson entre les concentrations en <i>Legionella pneumophila</i> cultivables et différents facteurs environnementaux.	175
Figure 2-57: Structure des tours aéroréfrigérantes des quatre sites étudiés.	176
Figure 2-58: Site de l'étude localisé sur la Loire en France, appelé site L.	195
Figure 2-59: Concentrations en micro-organismes déterminées pour chaque échantillon par des méthodes culturales.	196
Figure 2-60: Biplot d'analyse ACP sur les indices de diversité des communautés de <i>Legionella pneumophila</i> cultivables collectées à différentes périodes de l'année étudiée: richesse spécifique (indice de Chao), diversité (indice de Shannon) et structure de la communauté (indice de Pielou).	197

Figure 2-61: Relations entre les indices de diversité des communautés de <i>Legionella pneumophila</i> cultivables (Chao, Shannon et Piéou) et différents paramètres environnementaux présentant des coefficients de corrélation de Pearson significatifs.	198
Figure 2-62: Analyse de la composition des communautés de <i>Legionella pneumophila</i> cultivables de chaque échantillon avant, pendant et après traitement à la monochloramine, par approche nMDS basée sur l'indice de Bray Curtis (stress de Kruskal = 0.1567)	199
Figure 2-63: Diagrammes représentant (a) les sous populations de <i>Legionella pneumophila</i> cultivables partagées entre les périodes avant, pendant et après traitement à la monochloramine, ainsi que (b) le nombre de souches appartenant à chacune des sous populations détectées après traitement.....	200
Figure 2-64 : Effets estimés standardisés de chacune des variables testées et de leur combinaison sur (1a) le temps nécessaire pour inactiver 3 log de bactéries et sur (1b) l'activité de la monochloramine, représentée par le facteur n.....	223
Figure 2-65: Représentations des effets des facteurs expérimentaux sur les réponses Y_1 (a) et Y_2 (b): surfaces de réponse (à gauche) et tracés des contours (à droite) des interactions entre les variables (température, pH en haut ; concentrations initiales en monochloramine et en bactéries en bas).	224
Figure 2-66 : Inactivation des bactéries cultivables non- <i>Legionella</i> (3a) et <i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33152 et ATCC 33823 (3b) après traitement à la monochloramine.....	225
Figure 2-67 : Valeurs des $Ct_{99,9\%}$ des <i>Legionella</i> de référence ainsi que des souches non- <i>Legionella</i> mesurées après inactivation à la monochloramine.	226
Figure 2-68 : Valeurs des $Ct_{99,9\%}$ mesurées après inactivation à la monochloramine des <i>Legionella pneumophila</i> environnementales isolées des circuits de refroidissement dans différentes conditions de traitement à la monochloramine.	227
Figure 2-69 : Ensemble des effets des paramètres expérimentaux sur les réponses : tracés de la surface réponse (à gauche) et les tracés de contour correspondant (à droite) des interactions entre variables expérimentales sur le temps nécessaire pour inactiver 3 log de bactéries ainsi que sur l'activité de la monochloramine, représentée par le facteur n.	228
Figure A1-70 : Surveillance de la légionellose en France.	269
Figure A2-71 : Etapes de recherche et de dénombrement des <i>L. spp.</i> et <i>L. pneumophila</i> selon la norme NF T90-431.	270
Figure A2-72 : Ensemencement d'un échantillon d'eau sur un milieu GVPC.....	271
Figure A2-73: Observation à l'œil nu de colonies de <i>Legionella</i> cultivée sur GVPC.....	272
Figure A2-74: Observation à la loupe binoculaire de colonies de <i>Legionella</i> cultivée sur GVPC.	272
Figure A2-75 : Confirmation du genre <i>Legionella</i> selon la norme NF T90-431.	272
Figure A2-76 : Test d'immunofluorescence directe.	273
Figure A2-77 : Test d'agglutination au latex.	273
Figure A3-78: Schéma d'une tour à circuit de refroidissement dit "ouvert".	275
Figure A3-79: Schéma d'une tour à circuit de refroidissement dit "fermé".	275
Figure A4-80: Schéma général du fonctionnement du système de refroidissement d'une centrale nucléaire..	276
Figure A6-81: Schématisation des étapes de la PCR.	280
Figure A8-82: Cycle de vie d'un biofilm (d'après Cogan et Keener, 2004).	283
Figure A9-83: Structure des membranes des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des mycobactéries.	284
Figure A9-84: Schéma d'une spore bactérienne "typique" (d'après Russell, 1995).....	284
Figure A10-85: Pompes à efflux des bactéries à Gram négatif.	285
Figure A12-86: Structure d'une centrale nucléaire et point de mesure des débits du CRF.	290
Figure A13-87: Importance de la richesse et de l'équitabilité pour la définition de la diversité.	291
Figure A13-88: Courbes de raréfaction de différentes espèces d'arbres tropicaux (d'après Colwell <i>et al.</i> , 2004)	292
Figure A13-89: Modèles de distribution d'abondance des espèces au sein d'une communauté (d'après Magurran, 1988).....	293
Figure A13-90: Comparaison de différents estimateurs (graphique, paramétrique, et non paramétrique) sur la valeur calculée de la richesse spécifique de communautés bactériennes d'échantillons d'eaux (d'après Shaw <i>et al.</i> , 2008).	298
Figure A13-91: Représentation schématique (dendrogramme) de la similarité entre différents estimateurs (d'après Shaw <i>et al.</i> , 2008).	298

LISTE DES TABLES

Table 1-1: Espèces et sérogroupes du genre <i>Legionella</i> .	33
Table 1-2: Interactions (positives ou négatives) connues des légionelles avec d'autres espèces procaryotes (déterminées par des méthodes culturales).	66
Table 1-3: Interactions connues des légionelles avec des espèces eucaryotes.	68
Table 1-4: Familles des biocides et leurs mécanismes d'action (d'après Chapman, 2003).	76
Table 1-5: Efficacité des biocides chlorés sur <i>Escherichia coli</i> et <i>L. pneumophila</i> mesurée par le facteur Ct.	88
Table 1-6: Efficacité de différents biocides sur les micro-organismes (d'après Safe Drinking Water et National Research, 1987).	89
Table 2-7: Indices de discrimination (D) calculés pour l'IRS PCR, la PFGE, la SBT et ses 7 gènes par le typage des 45 souches de <i>Legionella pneumophila</i> .	Erreur ! Signet non défini.
Table 2-8: Amorces oligonucléotidiques utilisées pour le typage SBT des souches de <i>Legionella pneumophila</i> .	117
Table 2-9 : Amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage des sept gènes de la SBT.	118
Table 2-10: Polymorphisme nucléotidique des gènes utilisés pour le typage par SBT des souches de <i>Legionella pneumophila</i> .	119
Table 2-11 : Indices de diversité et leurs intervalles de confiance mesurés pour les communautés de <i>L. pneumophila</i> cultivables issues des bassins froids des centrales nucléaires localisées sur la Loire.	142
Table 2-12: Indices de diversité et leurs intervalles de confiance des communautés de <i>Legionella pneumophila</i> cultivables issues des bassins froids des centrales thermiques localisées sur la Loire.	194
Table 2-13 : Souches bactériennes sélectionnées pour la détermination de la sensibilité à la monochloramine.	221
Table 2-14 : Plan d'expérience multifactoriel et réponses mesurées pour chaque condition expérimentale.	222
Table A5-15: Fréquence de prélèvement à mettre en œuvre en fonction de la concentration en légionelles mesurée.	279
Table A10-16: Mécanismes d'efflux des bactéries résistantes aux biocides (d'après Poole, 2005).	286
Table A12-17: Caractéristiques des CRF des quatre CNPE de la Loire.	290

INTRODUCTION GENERALE

« L'eau est la chose la plus nécessaire à l'entretien de la vie, mais il est aisé de la corrompre... Car pour la terre, le soleil, les vents, ils ne sont point sujets à être empoisonnés, ni détournés, ni dérobés, tandis que tout cela peut arriver à l'eau, qui, pour cette raison, a besoin que la loi vienne à son secours. »

Platon, Livre VII, Les Lois, 400 ans avant Jésus Christ

Ainsi légiférait Platon 400 ans avant J.C., anticipant de près de 2400 ans nos préoccupations environnementales sur les ressources en eau.

L'eau est une des ressources la plus nécessaire pour la vie sur Terre. C'est dans l'eau qu'est apparue la vie sur notre planète, il y a environ 3.5 milliards d'années. Ces premiers organismes, qui n'étaient constitués que d'une seule cellule, sont les lointains ancêtres de tous les êtres vivants actuels. De nos jours, l'eau représente à la fois un élément essentiel à la vie mais aussi un enjeu environnemental, économique, social et culturel. Pour Loïc Fauchon, président du Conseil Mondial de l'Eau (CME), l'eau constitue l'une des principales tensions planétaires aujourd'hui. Soumise à de nombreuses pressions (gaspillage, pollution, érosion, climat...), la ressource en eau douce continentale est loin d'être illimitée. Tout en étant la ressource la plus abondante de la planète (elle recouvre environ 71 % de la surface du globe), l'eau a, dans une proportion de 98 %, une teneur en sel trop élevée pour servir aux usages humains. L'eau douce accessible, celle que l'on trouve dans les lacs, les rivières, les nappes phréatiques, ne compte que pour 0,25 % de la ressource totale mondiale. De plus, l'eau douce est inégalement répartie entre les territoires. Au cours du siècle dernier, l'utilisation d'eau douce a augmenté à un rythme deux fois plus élevé que la population. Face à ce risque vital de pénurie d'eau, les rencontres internationales se multiplient pour tenter de développer au niveau mondial une vision partagée de la gestion des ressources en eau et obtenir les engagements politiques nécessaires à la résolution de ce problème à l'échelle planétaire. Ainsi, en 1996, une collaboration internationale entre des Organisations Non Gouvernementales (ONG), plus de 50 gouvernements et des organisations internationales a été créée sous le nom du Conseil Mondial de l'Eau. Il se réunit tous les trois ans lors du « Forum Mondial de l'Eau » pour tenter de résoudre les problèmes liés à l'eau dans le monde. Le 6^{ème} Forum Mondial de l'Eau, baptisé « Le temps des solutions », s'est déroulé à Marseille du 12 au 17 Mars 2012. Lors de ce forum, 12 priorités d'action pour l'eau ont été définies collectivement. Ces priorités d'action correspondent aux engagements pris par l'Etat français dans le cadre du Grenelle de l'Environnement avec notamment la nécessité d'adapter la gestion économique de l'eau avec la préservation de cette ressource et de ses écosystèmes. Ainsi, une des priorités d'action pour l'eau est de « *porter une attention accrue aux interactions entre gestion de l'eau et préservation de la biodiversité* » en « *favorisant la gestion durable de la ressource* » (Forum Mondial de l'eau, Marseille, 12-17 Mars 2012, Engagements de l'Etat français).

En 2009, 33.4 milliards de m³ d'eau ont été prélevés en France métropolitaine pour satisfaire les besoins liés à la production d'eau potable, à l'industrie, à l'irrigation et à la production d'électricité. Les volumes prélevés ne sont pas répartis également selon les usages : la production d'électricité en utilise près des deux tiers, loin devant l'eau potable (17 %), l'industrie (10 %) et l'irrigation (9 %). En 2009, 64 % des prélèvements d'eau déclarés aux agences de l'eau en France métropolitaine sont consacrés au refroidissement des centrales thermiques et nucléaires. Plus de 95 % des volumes d'eau prélevée pour la production d'électricité sont restitués au milieu naturel, à proximité du point de pompage. Ces prélèvements sont effectués, à la fois en eau de surface (cours d'eau, canaux, retenues...) et

en eau souterraine, selon les besoins de chaque secteur et la disponibilité de la ressource mais la très grande majorité (82 %) des prélèvements se font dans les eaux de surface pour assurer le refroidissement des centrales thermiques et nucléaires.

La société Electricité De France (EDF) exploite, en France, 19 centrales nucléaires et 15 centrales thermiques à flamme. En 2005, la quantité d'eau prélevée pour le refroidissement de ces installations s'élevait à 42 milliard de m³ (eau douce de surface et eau de mer) dont 16.5 milliard de m³ sont utilisés par les centrales nucléaires en bord de rivière. Bien qu'en grande partie, ces volumes d'eau sont restitués au milieu naturel, de part ses usages des eaux de surface, EDF est directement impacté par les engagements de l'Etat français face aux problématiques mondiales de l'eau.

Ainsi, en 2009, les dirigeants du groupe EDF ont signé une Politique de Développement Durable qui s'appuie sur des engagements sociétaux forts : le Pacte Mondial « Global Compact » des Nations Unies, la Déclaration Universelle des Droits de l'Homme, la Convention de l'Organisation Internationale du Travail, les Principes Directeurs de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) et les accords de Responsabilité Sociale des Entreprises (RSE). Cette Politique de Développement Durable fixe plusieurs objectifs prioritaires pour contribuer à une production et à une utilisation de l'électricité plus respectueuse de l'environnement.

La politique environnementale d'EDF cherche à « *préserver la santé, les ressources, et l'environnement, notamment la biodiversité, par la maîtrise des impacts de ses activités industrielles et la gestion optimisée des déchets et rejets de ces mêmes activités* ». EDF s'est donc engagée à mettre en œuvre des programmes pour améliorer les performances environnementales et limiter les impacts de l'ensemble des installations sur les écosystèmes et sur la santé des populations. EDF a défini une Politique Biodiversité visant à mieux connaître et évaluer ses impacts sur la biodiversité, à la préserver, et à la restaurer le cas échéant.

L'utilisation des eaux de surface pour le refroidissement des centrales nucléaires en bord de rivière est à l'origine de rejet dans l'environnement aquatique de deux sortes : physico-chimique et biologique. Ces rejets ont pour origine une modification, dans les circuits de refroidissement (CRF), des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de l'eau prélevée. L'altération thermique de l'eau naturelle dans les circuits de refroidissement entraîne la sélection de micro-organismes à caractère thermophile. Certains de ces micro-organismes peuvent être pathogènes pour l'homme et posent un problème majeur de santé publique. Parmi ces micro-organismes figure l'espèce *Legionella pneumophila*, pouvant être responsable, en cas d'inhalation, d'une infection respiratoire aigüe, la légionellose, pouvant causer la mort. Les bactéries appartenant au genre *Legionella* sont des organismes ubiquitaires des environnements hydrotelluriques et colonisent de manière récurrente les systèmes aquatiques artificiels tels que les réseaux de distribution d'eau potable, les systèmes de climatisation... Le rejet de ce micro-organisme dans la rivière via l'eau de la purge du CRF et à l'atmosphère via le panache des tours aéroréfrigérantes (TAR), génère une exposition potentielle de la population au germe, qui est difficile à quantifier.

Les prélèvements d'eau ainsi que les rejets font l'objet d'une réglementation. En application du décret du 4 Mai 1995, les prélèvements d'eau et les rejets des Installations Nucléaires de Base (INB) sont instruit au niveau interministériel par la Direction Générale de la Sureté Nucléaire et de la Radioprotection (DGSNR), depuis rebaptisée Autorité de Sûreté Nucléaire

(ASN), sur la base de la Demande d'Autorisation de Rejet et de Prise d'Eau (DARPE) élaborée par l'exploitant. Cette instruction donne lieu à un arrêté unique couvrant le débit des prises d'eau ainsi que les limites des rejets thermiques et chimiques. Sur le plan réglementaire, le risque sanitaire lié à la présence de légionelles dans les réseaux d'eau des établissements de santé a contraint les autorités françaises à mettre en place, en 1997, une réglementation définissant les procédures de surveillance, d'entretien de ces installations et les seuils de concentration à ne pas dépasser. En parallèle, une réglementation spécifique aux INB a été établie en 2004. Ainsi, pour veiller au respect de ces seuils, EDF a mis en place un système de désinfection de l'eau des circuits de refroidissement concernés par voie chimique. Bien que très efficace pour limiter les développements de légionelles dans les circuits, l'utilisation d'un biocide chimique, en l'occurrence la monochloramine, entraîne le rejet dans l'environnement aquatique de substances chimiques (sous-produits de décomposition du biocide et de réaction de la monochloramine sur les matières organiques) potentiellement perturbatrices de l'écosystème naturel.

L'engagement d'EDF dans sa Politique de Développement Durable et les contraintes réglementaires microbiologiques et chimiques, associées à la présence de micro-organismes pathogènes dans les installations et aux rejets de substances chimiques dans l'environnement aquatique l'ont conduit à engager un certain nombre d'actions participant à la maîtrise des risques sanitaires et environnementaux des centrales nucléaires en bord de rivière.

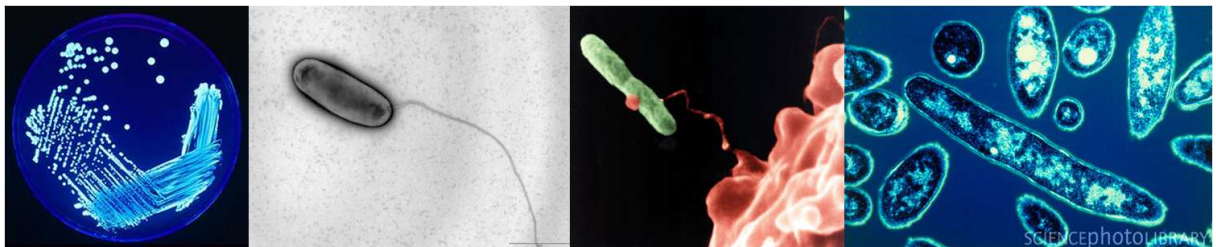
Dans cet objectif, EDF a engagé différentes actions de recherche visant à améliorer les connaissances de l'écologie des légionelles dans les circuits de refroidissement et des liens que ce genre bactérien entretient avec son environnement (physico-chimiques et microbiologiques) favorisant ou non leur prolifération. La spécificité des CRF des centrales nucléaires, de part leur dimensionnement et leur processus de fonctionnement (prélèvement d'eau brute issue de la rivière, échauffée à proximité du condenseur puis rejetée dans le milieu naturel), implique une écologie des légionelles différentes des autres systèmes aquatiques artificiels, et qui est donc très peu étudiée.

La synthèse bibliographique de ce manuscrit présente les caractéristiques générales de la bactérie *Legionella* ainsi que l'état de l'art sur les connaissances de l'écologie de ce micro-organisme dans les environnements naturels et artificiels. Dans cette partie sont également abordées les réactions des cellules bactériennes et des écosystèmes aquatiques face aux perturbations engendrées par l'utilisation de biocides chlorés tels que la monochloramine. Cette synthèse bibliographique permet de mettre en évidence la complexité des liens que ce genre bactérien entretient avec son environnement et les différentes caractéristiques de l'écosystème à étudier nécessaires pour une meilleure compréhension de leur écologie.

Dans l'étude expérimentale, nous avons cherché à caractériser la diversité et la dynamique des sous-populations de *Legionella*, en lien avec la qualité physico-chimique et microbiologique de l'eau des circuits de refroidissement des centrales nucléaires en bord de rivière. Par une approche *in situ*, des mécanismes hypothétiques de régulation de la concentration en *Legionella* cultivables ont été proposés. L'effet du traitement à la monochloramine sur les cellules et les communautés de légionelles a également été étudié.

CHAPITRE 1 :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



1. INTRODUCTION

Les légionelles sont des bactéries naturellement présentes dans l'environnement. Elles font parties intégrante des écosystèmes naturels aquatiques, tels que les rivières, les lacs ou les eaux souterraines (Fliermans *et al.*, 1981; Declerck *et al.*, 2007b). A partir de ces environnements naturels où elles sont généralement peu nombreuses, ces bactéries peuvent coloniser des réservoirs artificiels comme les réseaux de distribution d'eau, les systèmes de climatisation, les tours aéroréfrigérantes (Ortiz-Roque et Hazen, 1987; Verissimo *et al.*, 1991; Wullings et van der Kooij, 2006; Parthuisot *et al.*, 2010)... Ces systèmes artificiels sont propices à leur développement et peuvent, pour certains conduire à leur aérosolisation. L'exposition de la population à des gouttelettes contaminées peut causer, selon l'espèce aérosolisée, une pneumopathie atypique sévère appelée la maladie du Légionnaire (Bollin *et al.*, 1985; Turetgen *et al.*, 2005; Declerck, 2009; Gomez-Valero *et al.*, 2009; Carducci *et al.*, 2010; Schoen et Ashbolt, 2011).

Pour lutter contre la présence de ce micro-organisme dans les systèmes artificiels et limiter l'exposition des populations, une surveillance régulière des concentrations des légionelles a été mise en place et peut aboutir à l'utilisation de traitements physiques et/ou chimiques, afin de réduire la colonisation des réseaux.

Cependant, cette surveillance ne permet pas d'évaluer le risque sanitaire lié à la présence de ce micro-organisme dans les réseaux d'eaux. Pour effectuer cette évaluation, il est indispensable d'améliorer les connaissances sur l'écologie des légionelles, à la fois dans leur milieu naturel mais aussi dans les systèmes artificiels en présence ou non de traitement (Buse *et al.*, 2012).

L'analyse écologique des systèmes aquatiques prend en compte l'ensemble des organismes présents qui interagissent entre eux et avec leur environnement. La compréhension de ces systèmes complexes et du rôle des légionelles dans leur environnement, permettrait de mieux appréhender les développements et de lutter plus efficacement contre leur présence dans les systèmes artificiels, sources de contamination des populations humaines (Buse *et al.*, 2012).

La présente synthèse bibliographique aborde différents thèmes liés aux connaissances actuelles sur l'écologie des légionelles. La première partie concerne les connaissances générales sur les légionelles, de l'épidémiologie à son identification moléculaire. La deuxième partie s'attarde sur l'état de l'art de l'écologie des légionelles en milieu naturel et artificiel et permet d'aborder différentes notions écologiques indispensables à la compréhension des systèmes aquatiques. Dans une dernière partie est traité l'impact des traitements de désinfection chimiques utilisés dans les systèmes artificiels sur les légionelles, d'un point de vue écologique mais aussi cellulaire.

2. LEGIONELLA

2.1. HISTORIQUE

En 1976, lors de la 58^{ème} convention de l'American Legion, 4400 vétérans résident dans un hôtel de Philadelphie. 182 d'entre eux contractent une pneumopathie atypique et 29 personnes décèdent suite à cette maladie que la communauté scientifique nomme la Maladie du Légionnaire (Fraser *et al.*, 1977; McDade *et al.*, 1977). Ce n'est que six mois plus tard, que la bactérie responsable de cette épidémie a été isolée (McDade *et al.*, 1977; Winn, 1988). Elle a été appelée *Legionella pneumophila* (Figure 1-1). La source de l'épidémie a été découverte, il s'agissait d'une contamination par voie aérienne issue du système de climatisation de l'hôtel (McDade *et al.*, 1977; Winn, 1988). En 1979, le genre *Legionella* a été établi. Il constitue l'unique genre appartenant à la famille des *Legionellaceae* (Brenner *et al.*, 1979).

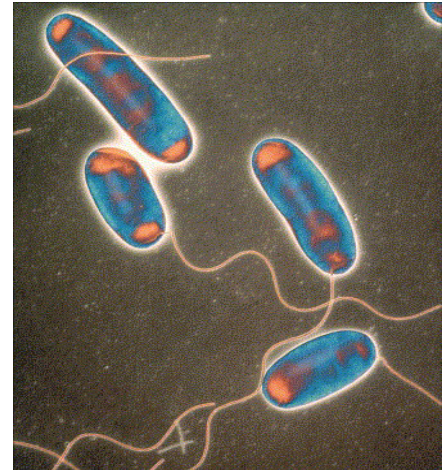


Figure 1-1: *L. pneumophila*, microscopie électronique à transmission recolorisée (d'après Fraser, 2005).

Par la suite, des études rétrospectives ont permis d'identifier les légionelles comme source de plusieurs épidémies. Des études menées sur des tissus humains conservés depuis plus de 50 ans provenant de personnes ayant contractés une pneumopathie étaient infectés par des bactéries de différentes espèces appartenant au genre *Legionella*. Ils s'agissaient des bactéries *L. micdadei*, *L. pneumophila* et *L. bozemanii* (McDade, 2002).

2.2. INFECTIONS A *LEGIONELLA*

2.2.1. VOIE D'EXPOSITION

La contamination se produit par inhalation d'aérosols contaminés ou par aspiration de gouttelettes chargées de bactéries (Bollin *et al.*, 1985). La dose infectieuse de *Legionella* sp. inhalée entraînant la légionellose chez l'homme est à ce jour incertaine. Cependant, selon Riffard *et al.* (2003) et d'autres études moins récentes (Berendt *et al.*, 1980; Meenhorst *et al.*, 1983), il semble que la dose minimale nécessaire pour causer une infection soit de l'ordre de 10 Unités Formant Colonies par millilitres (UFC/mL) d'air inhalée.

Une fois inhalées, si les aérosols contaminés par la bactérie atteignent les alvéoles pulmonaires, les légionelles pénètrent par phagocytose dans les macrophages et résident dans un phagosome où elles se multiplient activement (Figure 1-2). Suite à la phase de multiplication dans la cellule hôte, les bactéries provoquent un épuisement des ressources nutritionnelles et entrent en phase stationnaire. Lors de cette phase, plusieurs gènes de virulence sont exprimés, permettant à la fois la libération et la transmission des cellules bactériennes vers une nouvelle cellule hôte (voir § 4.1.1) (Abu Kwaik *et al.*, 1998; Cianciotto, 2001; Jules et Buchrieser, 2007).

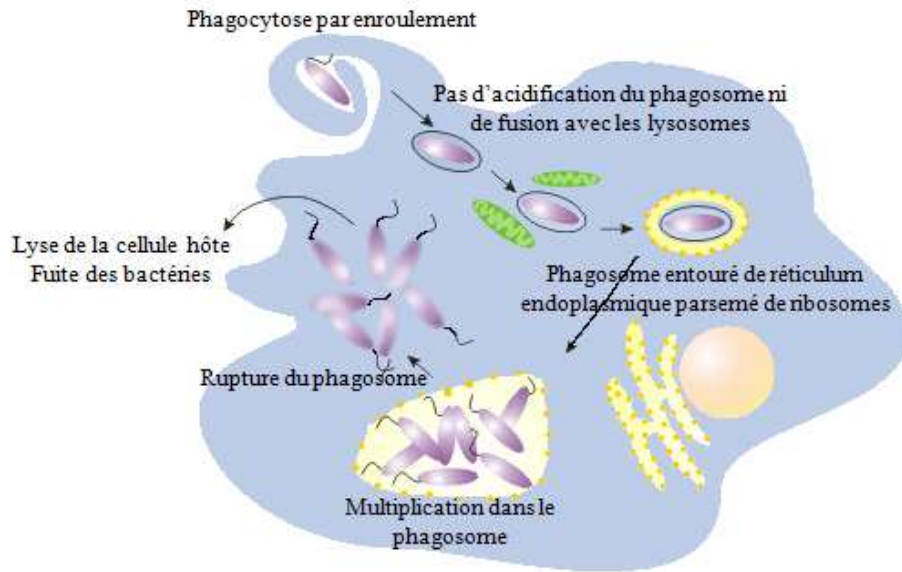


Figure 1-2: Cycle de vie schématisique de *L. pneumophila* dans les macrophages (d'après Swanson et Hammer, 2000).

Les sources d'aérosols contaminés par des légionelles peuvent être variées. La colonisation de tours aéroréfrigérantes (TAR) par des légionelles a été mise en cause dans des cas groupés de légionellose en France (épidémie à Paris en 1998, à Lens en 2003...). Les autres sources incriminées sont les circuits de distribution d'eau chaude sanitaire (Figure 1-3), les systèmes de climatisation, les eaux thermales chaudes... (Campese *et al.*, 2011a).

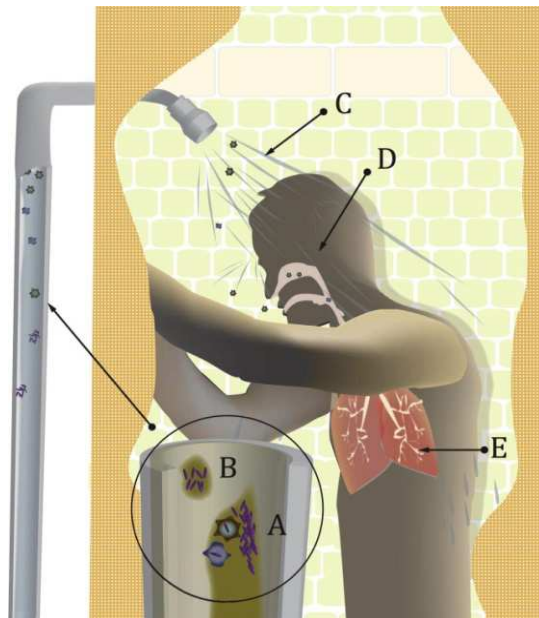


Figure 1-3: Modèle conceptuel d'exposition au germe *Legionella* à partir de l'inhalation d'aérosols provenant de douche contenant des légionelles (d'après Schoen et Ashbolt, 2011).

Legionella se multiplie au sein du biofilm présent dans la plomberie, en le colonisant de manière libre ou dans un hôte protozoaire (A). Pendant un événement de douche, *Legionella* se détache du biofilm (B). Les bactéries sont alors aérosolisées (C), puis inhalées (D). Une fraction de ces bactéries inhalées se dépose dans la région alvéolaire des poumons (E) pouvant provoquer une infection.

2.2.2. EPIDEMIOLOGIE

Les bactéries du genre *Legionella* sont associées à deux pathologies : une forme bénigne appelée Fièvre de Pontiac et la maladie des légionnaires mortelle dans plus de 10% des cas en France (Campese *et al.*, 2011a; 2011b). La Fièvre de Pontiac est une forme analogue à un syndrome grippal, non évolutif et à guérison spontanée en deux à cinq jours (Glick *et al.*, 1978). La maladie du légionnaire correspond à une pneumopathie aigue survenant chez les personnes fragilisées (personnes âgées, immunodéprimés...) (McDade *et al.*, 1977).

Parmi les 50 espèces appartenant au genre *Legionella*, 20 d'entre elles ont été reconnues comme agent pathogène pour l'homme. Yu *et al.* (2002) ont montré par une étude internationale que l'espèce *L. pneumophila* est l'agent responsable à 91.5% des cas de légionellose, dont 84.2% des cas incriminés au sérotype 1. Les autres espèces présentant un pouvoir pathogène sont l'espèce *L. longbeachae* pour 3.9% des cas, *L. bozemanii* pour 2.4% des cas suivies des espèces *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L. wadsworthii* et *L. anisa* responsables de 2.2% des cas de légionellose. En Australie, Nouvelle Zélande et Japon, les infections par les légionelles sont dues, en proportion égale, aux espèces *L. pneumophila* et *L. longbeachae* (Montanaro-Punzengruber *et al.*, 1999; Koide *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2007). En France, 1540 cas, dont 12% mortels, ont été enregistrés en 2010 correspondant à une incidence de 2.4 cas pour 100 000 habitants (Figure 1-4). Depuis 2005, une diminution du taux d'incidence de la légionellose a été observée jusqu'en 2010 où une augmentation de 28% des cas de légionellose a été recensée par rapport à l'année 2009 (Campese *et al.*, 2011b).

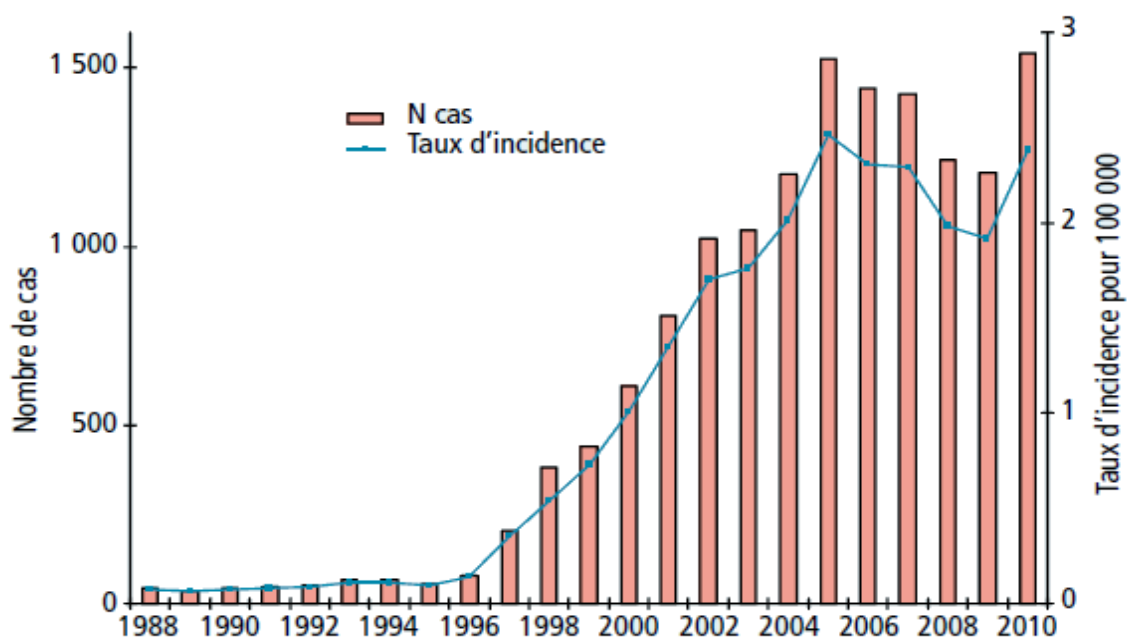


Figure 1-4: Evolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose en France, 1988-2010 (d'après Campese *et al.*, 2011b).

En France, bien que la transmission interhumaine n'ait jamais été décrite (Fields, 1996), la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987 (décret n°87-1012) (*Annexe I: Déclaration des cas de légionellose*). L'Institut de Veille Sanitaire (InVS), en partenariat avec le Centre National de Référence des légionelles (CNRL), est responsable de la surveillance de cette maladie en France. Le CNRL, collaborateur de l'Organisation

Mondiale de la Santé (OMS) participe également au réseau de surveillance internationale des légionelloses.

En Europe, un groupe de travail sur les infections au genre *Legionella* a été créé en 1986 (European Working Group for *Legionella* Infections - EWGLI). Ce groupe de travail a pour objectif l'amélioration des connaissances et la centralisation des informations concernant l'épidémiologie et les aspects microbiologiques (cliniques et environnementaux) des infections par les légionelles. Ce groupe héberge également un réseau de surveillance de la maladie du Légionnaire. Il a été appelé successivement EWGLI Network (EWGLINet) puis, en 2010, European Legionnaires's Disease Surveillance Network (ELDSNet). Cette institution est gérée par le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies (European Center for Disease Prevention and Control – ECDC) situé à Stockholm en Suède. L'ECDC est garant de la base de données du système européen de surveillance des légionelloses (The European Surveillance System – TESSy) qui recense, valide, analyse et transmet les données relatives aux infections par le genre *Legionella* en Europe.

2.3. REGLEMENTATION

Il est aujourd'hui clairement établi que les TAR et les systèmes de distribution d'eau chaude sanitaire, notamment via les douches, colonisés par des légionelles constituent les sources les plus souvent incriminées dans des cas de légionellose (Fernandez *et al.*, 2002; Jansa *et al.*, 2002; Che *et al.*, 2009).

Pour limiter les risques de contamination des populations environnantes, la surveillance des *Legionella* spp. (toute espèce appartenant au genre *Legionella*) et de *L. pneumophila* est encadrée par la réglementation. Elle prévoit un contrôle :

- dans les eaux minérales destinées à des usages thérapeutiques des établissements thermaux, une fois par mois aux points d'usage les plus sensibles (arrêté du 19 Juin 2000) ;
- dans les TAR, une fois par mois (pour les installations soumises à autorisation de rejet préfectorale) ou tous les deux mois (pour les installations soumises à déclaration de rejet préfectorale) pendant la période de fonctionnement des installations (arrêtés du 13 Décembre 2004) ;
- dans les réseaux d'eau chaude sanitaire de tous les établissements recevant du public (établissements de santé, hôtels, campings...) une fois par an aux points d'usage des réseaux d'eau chaude sanitaire (arrêté du 1er Février 2010).

Le dénombrement des *Legionella* totales et des *L. pneumophila* est réalisé par la méthode culturale normalisée NF T90-431 (Annexe II: Norme NF T90-431 « Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* »).

Des valeurs cibles de concentrations à ne pas dépasser ont été proposées en 2001 par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) sur la base des connaissances scientifiques et des observations de terrain disponibles à cette date. Ces valeurs ne sont pas fondées sur la relation dose-réponse chez l'homme qui reste incertaine à ce jour (Riffard *et al.*, 2003). Les seuils fixés dépendent du type d'installation :

- dans le cas des eaux chaudes sanitaires, la réglementation française fixe la valeur cible en *L. pneumophila* à 10^3 UFC/L ;
- dans le cas des établissements thermaux, la valeur cible en *Legionella* totales et en *L. pneumophila* correspond à l'absence de bactéries cultivables détectables ;

- pour ce qui est des systèmes industriels faisant appel à une projection d'eau dans un flux d'air (TAR), une rubrique spécifique a été créée dans la réglementation des Installations Classées pour l'Environnement (ICPE). Il s'agit de la rubrique 2921 de l'Arrêté du 13 Décembre 2004 intitulée « Installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air » (*Annexe IV : Installation de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air. Exemple d'une tour aéroréfrigérante à contre-courant d'un circuit de refroidissement d'une centrale nucléaire*). Elle prévoit trois cas de figures suivant la concentration en *Legionella* totale mesurée dans le système :
 - ➔ seuil d'acceptabilité de l'eau d'appoint : 500 UFC/L (limite de quantification de la méthode culturale pour les eaux sales). Si l'eau d'appoint ne respecte pas ce seuil, un traitement de l'eau d'appoint permettant d'atteindre ces objectifs doit être mis en place ;
 - ➔ seuil d'action pour l'eau circulante : 10^3 UFC/L. La fréquence d'analyse du taux de concentration en *Legionella* totales est augmentée, elle passe de trimestrielle à bimestrielle. Des mesures, telles l'utilisation de traitements physiques ou chimiques, pour abaisser la concentration sont mises en œuvre ;
 - ➔ seuil d'arrêt pour l'eau circulante : 10^5 UFC/L. Le système est arrêté, vidangé, nettoyé et désinfecté avant la remise en route de l'installation de refroidissement. Des mesures des taux de concentrations en *Legionella* totales dans le circuit devront être réalisées tous les 15 jours pendant trois mois.

Par ailleurs, une réglementation particulière a été mise en place pour les aéroréfrigérants des Centres Nucléaires de Production d'Electricité (CNPE). Ces systèmes de refroidissement sont soumis à la réglementation des INB (recommandations de l'ASN) (*Annexe V : Réglementation des installations Nucléaires de Base*). D'après ces recommandations, EDF doit mettre en place toutes mesures de prévention adaptées afin de maintenir la concentration en *Legionella* totales en dessous de $5 \cdot 10^6$ UFC/L dans l'eau des circuits de refroidissement de tous les CNPE, excepté le CNPE de Chinon, qui, équipé de petites tours, doit maintenir une concentration en *Legionella* totales inférieure à $5 \cdot 10^5$ UFC/L. Ces recommandations se déclinent aussi en termes de fréquence d'analyse. La périodicité des mesures pour les INB est :

- mensuelle si la concentration en *Legionella* totales est inférieure à 10^3 UFC/L ;
- bimensuelle si la concentration en *Legionella* totales est comprise entre 10^3 et 10^4 UFC/L (inférieure à 10^3 UFC/L pour Chinon) ;
- hebdomadaire si la concentration en *Legionella* totales est comprise entre 10^4 et 10^5 UFC/L (entre 10^3 et 10^4 UFC/L pour Chinon) ;
- et journalière si la concentration en *Legionella* totales est supérieure à 10^5 UFC/L (10^4 pour le CNPE de Chinon).

Le contrôle de la colonisation par les légionelles est réalisé sur des échantillons provenant du bassin froid (*Annexe IV : Installation de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air. Exemple d'une tour aéroréfrigérante à contre-courant d'un circuit de refroidissement d'une centrale nucléaire*), à l'aide de la méthode normalisée de dénombrement par culture (NF T90-431).

2.4. TAXONOMIE

Les légionelles appartiennent à la famille des *Legionellaceae*. Cette famille, constituée uniquement du genre *Legionella*, a été établie en 1979 par Brenner *et al.* (1979) et constitue avec la famille des *Coxiellaceae* l'ordre des *Legionellales* appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*. Le genre *Legionella* comprend actuellement plus de 50 espèces connues et ce nombre augmente régulièrement (Table 1-1) (Fields *et al.*, 2002; Diederer, 2008).

Toutes les espèces de légionelles isolées de sources cliniques ont également été détectées dans l'environnement à l'exception de *L. hackeliae* et *L. tusconensis* (Edelstein et Cianciotto, 2006).

Certaines espèces possèdent plusieurs sérogroupes (voir § 3.3.1), l'espèce *L. pneumophila* en compte 15 alors que les autres espèces n'en possèdent au maximum que deux. Trois sous-espèces ont été décrites pour l'espèce *L. pneumophila* : *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, *L. pneumophila* subsp. *fraseri* et *L. pneumophila* subsp. *pascuallei* (Brenner *et al.*, 1988). Ces sous-espèces peuvent présenter des souches appartenant à différents sérogroupes (Brenner *et al.*, 1988):

- sérogroupes 1 à 14 pour *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ;
- sérogroupes 1, 3, 4 et 5 pour *L. pneumophila* subsp. *fraseri* ;
- séro groupe 5 uniquement pour *L. pneumophila* subsp. *pascuallei*.

Certaines espèces de légionelles requièrent des facteurs de croissance encore inconnus et ne peuvent être cultivées sur des milieux synthétiques. Ces espèces, parmi lesquelles figure *L. lytica* sont appelées des pathogènes amibiens "*Legionella* – like" (« *Legionella*-like amoebal pathogen » ou LLAP) et ne peuvent être isolées que par co-culture avec des amibes (Adeleke *et al.*, 1996; Hookey *et al.*, 1996).

2.5. CARACTERES BIOCHIMIQUES GENERAUX

Les membres de la famille des *Legionellaceae* sont des bacilles aérobies à Gram négatif non sporulés, non capsulés et non acido-résistants. Ces bactéries mesurent de 0.3 à 0.9 µm de large sur 2 à 20 µm de long (Winn, 1988). La majorité des espèces de *Legionella* sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles en position polaire ou latérale à l'exception de *L. londiniensis*, *L. nautarum* et *L. oakridgensis* (Ott *et al.*, 1991; Stout *et al.*, 2003). La forme et la taille de ces micro-organismes sont très variables et dépendent des conditions, du stade ainsi que du mode de croissance (intracellulaire ou extracellulaire) (Edelstein et Cianciotto, 2006).

Les légionelles ont des besoins nutritionnels complexes et particuliers. Elles sont auxotrophes vis-à-vis de certains acides aminés, notamment la L-cystéine et la méthionine (Fields, 1992). Elles se distinguent des autres bactéries saccharolytiques par leurs exigences en sels de fer lors du primo-isolement sur des milieux solides (Diederer, 2008). Les légionelles n'hydrolysent pas les sucres et sont incapables de réduire les nitrates. Ces bactéries sont catalase et gélatinase positive, oxydase négative ou faiblement positive et uréase négative (Pine *et al.*, 1979). *L. pneumophila* présente la particularité par rapport aux autres espèces d'être capable d'hydrolyser l'hippurate (exceptés les sérogroupes 4 et 15) (Hebert, 1981; Garrity, 2005).

Table 1-1: Espèces et sérogroupes du genre *Legionella*.

Espèce	Date de publication	Source	Nombre de sérogroupes
<i>L. adelaidensis</i>	1991	Eau	1
<i>L. anisa</i>	1985	Eau ^a	1
<i>L. beliardensis</i>	2001	Eau	1
<i>L. birminghamensis</i>	1987	Humain	1
<i>L. bozemanæ</i> (<i>Fluoribacter bozemanæ</i>)	1980	Humain	1
<i>L. brunensis</i>	1988	Eau	1
<i>L. busanensis</i>	2003	Eau	1
<i>L. cardiaca</i>	2012	Humain	1
<i>L. cherrii</i>	1985	Eau	1
<i>L. cincinnatiensis</i>	1988	Humain	1
<i>L. drancourtii</i>	2004	Amibe	1
<i>L. dresrenensis</i>	2010	Eau	1
<i>L. drozanskii</i>	2001	Amibe	1
<i>L. dumoffii</i> (<i>Fluoribacter dumoffii</i>)	1980	Humain	1
<i>L. erythra</i>	1985	Eau	2
<i>L. fairfieldensis</i>	1991	Eau	1
<i>L. fallonii</i>	2001	Amibe	1
<i>L. feeleei</i>	1984	Eau ^a	2
<i>L. geestiana</i>	1993	Eau	1
<i>L. genomospecies</i>	1996	Eau	1
<i>L. gormanii</i> (<i>Fluoribacter gormanii</i>)	1980	Eau ^a	1
<i>L. gratiana</i>	1989	Eau	1
<i>L. gresilensis</i>	2001	Eau	1
<i>L. hackeliae</i>	1985	Humain ^b	2
<i>L. impletisoli</i>	2007	Sol	1
<i>L. israelensis</i>	1986	Eau	1
<i>L. jamestowniensis</i>	1985	Eau	1
<i>L. jordanis</i>	1982	Eau ^a	1
<i>L. lansingensis</i>	1992	Humain	1
<i>L. londoniensis</i>	1993	Eau	1
<i>L. longbeachae</i>	1981	Humain	2
<i>L. lytica</i>	1996	Humain	1
<i>L. maceachernii</i> (<i>Tatlockia maceachernii</i>)	1985	Eau ^a	1
<i>L. micdadei</i> (<i>Tatlockia micdadei</i>)	1980	Humain	1
<i>L. moravica</i>	1988	Eau	1
<i>L. nagasakiensis</i>	2012	Eau ^a	1
<i>L. nautarum</i>	1993	Eau	1
<i>L. oakridgensis</i>	1983	Eau ^a	1
<i>L. parisiensis</i>	1985	Eau ^a	1
<i>L. pneumophila</i>	1979	Humain	15
<i>L. quateirensis</i>	1993	Eau	1
<i>L. quinlivanii</i>	1989	Eau	2
<i>L. rowbothamii</i>	2001	Amibe	1
<i>L. rubilucens</i>	1985	Eau	1
<i>L. sainthelensi</i>	1984	Eau ^a	2
<i>L. sainticrucis</i>	1985	Eau	1
<i>L. shakespearei</i>	1992	Eau	1
<i>L. spiritensis</i>	1985	Eau	1
<i>L. steigerwaltii</i>	1985	Eau	1
<i>L. taurinensis</i>	1999	Eau	1
<i>L. tusconensis</i>	1989	Humain ^b	1
<i>L. wadsworthii</i>	1982	Humain	1
<i>L. waltersii</i>	1996	Eau	1
<i>L. worsleiensis</i>	1993	Eau	1
<i>L. yabuuchiae</i>	2007	Sol	1

^a Des sources humaines ont également été rapportées^b Aucune source environnementale n'a été rapportée

La paroi des légionelles est particulière par rapport à celle des autres bactéries à Gram négatif. Elle est hydrophobe et riche en acides gras ramifiés habituellement retrouvés chez les bactéries à Gram positif (Miller, 1983). Chaque espèce comporte une composition spécifique en divers acides gras, que ce soit en qualité ou en quantité (Moss et Dees, 1979; Lambert et Moss, 1989). Les légionelles sont également caractérisées par une structure particulière des ubiquinones de leur membrane cellulaire. Alors que la plupart des bactéries à Gram négatif renferment des ubiquinones dont les chaînes latérales comptent 6 à 10 unités isopréniques, les ubiquinones des légionelles en comportent 9 à 14 (Collins et Gilbert, 1983; Gilbert et Collins, 1985).

Les légionelles possèdent un génome d'une taille approximative de 2.5×10^9 daltons (soit environ 3.9 mégabases) (Bender *et al.*, 1990). La composition molaire de leur génome en base G et C varie entre 38 et 52% (Gomez-Valero *et al.*, 2009).

Les légionelles sont capables de se développer *in vitro* sur une gamme de température allant de 25 à 42°C avec un optimum de croissance à $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (Thacker *et al.*, 1981). Leur pH optimal de croissance *in vitro* est de 6.9 (Wadowsky *et al.*, 1985).

3. TYPAGE DES LEGIONELLES

3.1. TAXONOMIE ET PHYLOGENIE BACTERIENNE

Une étude écologique repose, entre autre, sur l'identification et la détermination des liens qui existent entre les différents organismes du système biologique étudié. La taxonomie et la phylogénie sont des disciplines scientifiques qui permettent d'identifier, de classer et de déterminer les liens de parentés entre les organismes (Vandamme *et al.*, 1996; van Belkum *et al.*, 2001). La classification des êtres vivants est réalisée selon le nombre de caractères que les organismes ont en commun. Les organismes peuvent, ainsi, être identifiés à différentes échelles (Fry *et al.*, 1991; Hookey *et al.*, 1996) (Figure 1-5).

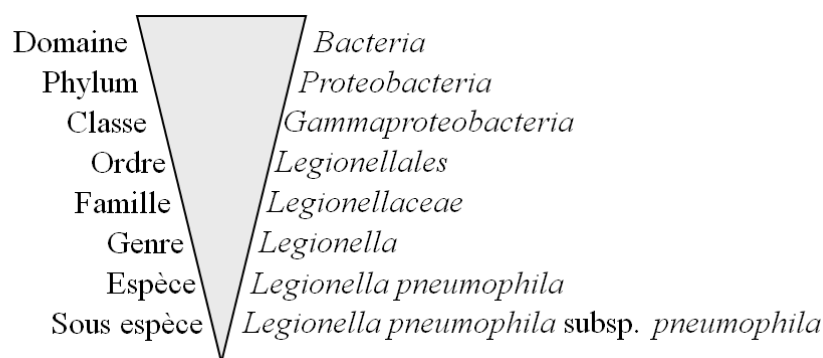


Figure 1-5: Rang taxonomique. Exemple de la légionelle.

La notion d'espèce bactérienne a été définie en 1987 par le Comité International de Systématique Bactériologique (« International Committee on Systematic Bacteriology » ou ICSB) (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2002; Konstantinidis *et al.*, 2006) comme étant le rassemblement de différentes souches ayant de fortes homologues dans leur séquence d'ADN. Ainsi, une espèce bactérienne regroupe des souches présentant un pourcentage d'hybridation de leur ADN supérieur à 70% ou à une identité moyenne en

nucléotides de 95% (Stackebrandt et Goebel, 1994; Rossello-Mora et Amann, 2001; Konstantinidis et Tiedje, 2005; Konstantinidis *et al.*, 2006; Wenjun *et al.*, 2009).

Les mutations de la séquence génétique révèlent l'évolution de l'individu. Pour reconstituer des phylogénies, on utilise des marqueurs phylogénétiques qui peuvent être différents gènes ou les protéines correspondantes. En fonction de la molécule choisie et selon la pression de sélection, le taux de mutation est plus ou moins élevé et permet d'accéder à un passé plus ou moins lointain. Des gènes ayant un taux de mutation faible permettent d'accéder à un passé lointain tandis que des gènes ayant un taux de mutation élevé permettent d'accéder à des événements d'évolution récents (Ludwig *et al.*, 1998; Rossello-Mora et Amann, 2001).

Ainsi, pour établir la phylogénie des bactéries, le marqueur phylogénétique doit répondre à plusieurs critères (Stackebrandt et Goebel, 1994; Rossello-Mora et Amann, 2001; Rajendhran et Gunasekaran, 2010):

- être universellement distribué dans tout le groupe bactérien étudié ;
- posséder des régions hautement conservées pour permettre l'alignement et donc la comparaison des séquences de toutes les bactéries ;
- refléter les changements évolutifs de l'organisme, c'est à dire avec une vitesse de mutation lente qui correspond à la vitesse d'évolution des espèces bactériennes.

Aujourd'hui les marqueurs phylogénétiques les plus utilisés sont les gènes ribosomiques et notamment celui de l'ARNr 16S. Des individus présentant plus de 97% d'identité entre leur gène de l'ARNr 16S ont généralement un taux d'hybridation de leur ADN supérieur à 70% et appartiennent à une même espèce (Stackebrandt et Goebel, 1994; Rossello-Mora et Amann, 2001; Staley, 2009). Bien que la résolution du gène de l'ARNr 16S au niveau de l'espèce soit contestée, ce gène fait référence en phylogénie bactérienne (Fox *et al.*, 1992; Rossello-Mora et Amann, 2001).

Les gènes ribosomiques codent pour les ARN ribosomiques qui associés à des protéines ribosomiques permettent la synthèse des protéines. Ils peuvent être en une ou plusieurs copies sur le génome. Il existe chez les bactéries trois gènes ribosomiques qui codent pour des ARNr de différentes tailles : l'ARNr 23S, l'ARNr 16S et l'ARNr 5S (Gutell *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1996; Rossello-Mora et Amann, 2001; Rajendhran et Gunasekaran, 2010) (Figure 1-6). Les gènes ribosomiques sont de bons marqueurs phylogénétiques car ils possèdent des domaines hautement conservés qui entourent des domaines variables (Figure 1-7). Ces gènes permettent de cibler le domaine *Bacteria* par les régions conservées et d'identifier les différentes espèces par les régions variables (Noller *et al.*, 1985; Gutell *et al.*, 1994). Le gène de l'ARNr 16S, d'une taille de 1540 nucléotides, est plus grand que le gène de l'ARNr 5S, les informations qu'il porte sont donc plus nombreuses. Il est plus petit que le gène de l'ARNr 23S ce qui rend plus facile son analyse, notamment par le séquençage du gène. Il permet donc d'obtenir aisément des données sur la phylogénie suffisamment informatives (Fry *et al.*, 1991; Hookey *et al.*, 1996; Vandamme *et al.*, 1996; Theron et Cloete, 2000; Rossello-Mora et Amann, 2001; Park *et al.*, 2004; Ciccarelli *et al.*, 2006; Rajendhran et Gunasekaran, 2010).

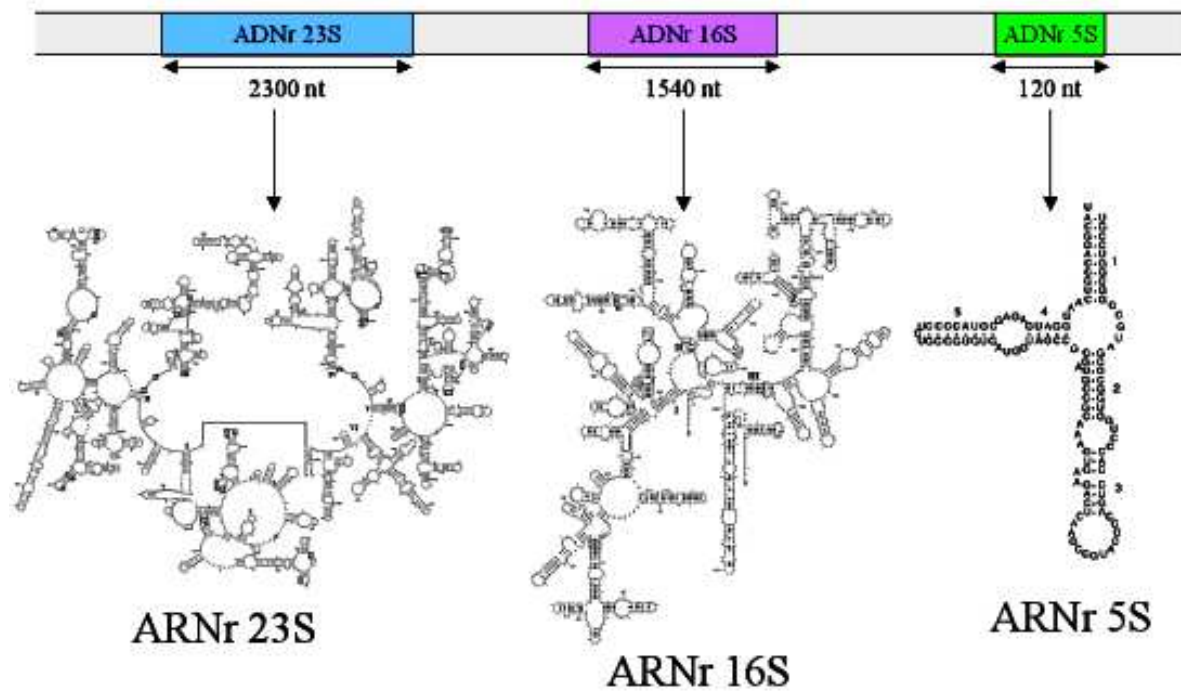


Figure 1-6: Gènes ribosomiques codant pour les ARNr 23S, 16S et 5S chez *Escherichia coli*.

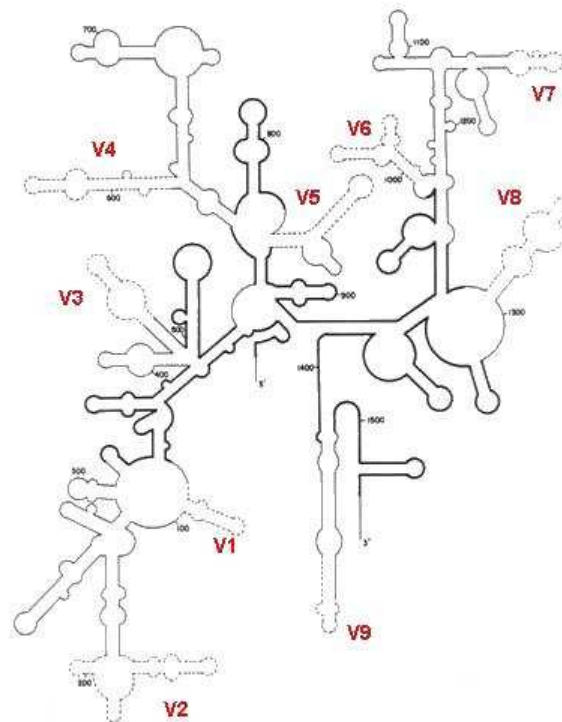


Figure 1-7: Structure de l'ARNr 16S des bactéries qui présente neuf régions variables (V1 à V9) entourées de régions hautement conservées.

En écologie, la taxonomie et la phylogénie permettent de mieux comprendre la biodiversité d'un écosystème en catégorisant les organismes présents et en déterminant les liens de parenté existant entre eux. Ces disciplines permettent également de déterminer sur quelle échelle est analysé l'écosystème, c'est-à-dire, quels types de population seront étudiés (classes, genres, espèces ou souches bactériennes). Les méthodes choisies pour identifier les organismes présents dans un écosystème doivent répondre à des critères taxonomiques et

phylogénétiques définis en amont de l'étude. La biodiversité mesurée sera dépendante de la résolution taxonomique de la méthode choisie. Le degré de compréhension de l'assemblage microbien de l'écosystème dépendra du caractère phylogénétique de la méthode.

L'étude de la biodiversité des communautés microbiennes implique des difficultés méthodologiques inhérentes aux caractéristiques mêmes des bactéries. En effet, leur petite taille, l'absence de caractères phénotypiques distinguables et l'absence de cultivabilité de la majorité des bactéries rendent la mesure de la biodiversité des micro-organismes difficile (Theron et Cloete, 2000; Dorigo *et al.*, 2005). Ainsi, les critères de sélection des méthodes de typage dépendent essentiellement de la possibilité d'isoler les souches bactériennes et de l'objectif de l'étude (déterminer l'origine de cas clinique ou surveillance sur le long terme des micro-organismes d'intérêt). Ces critères sont détaillés en Figure 1-8 (Wenjun *et al.*, 2009).

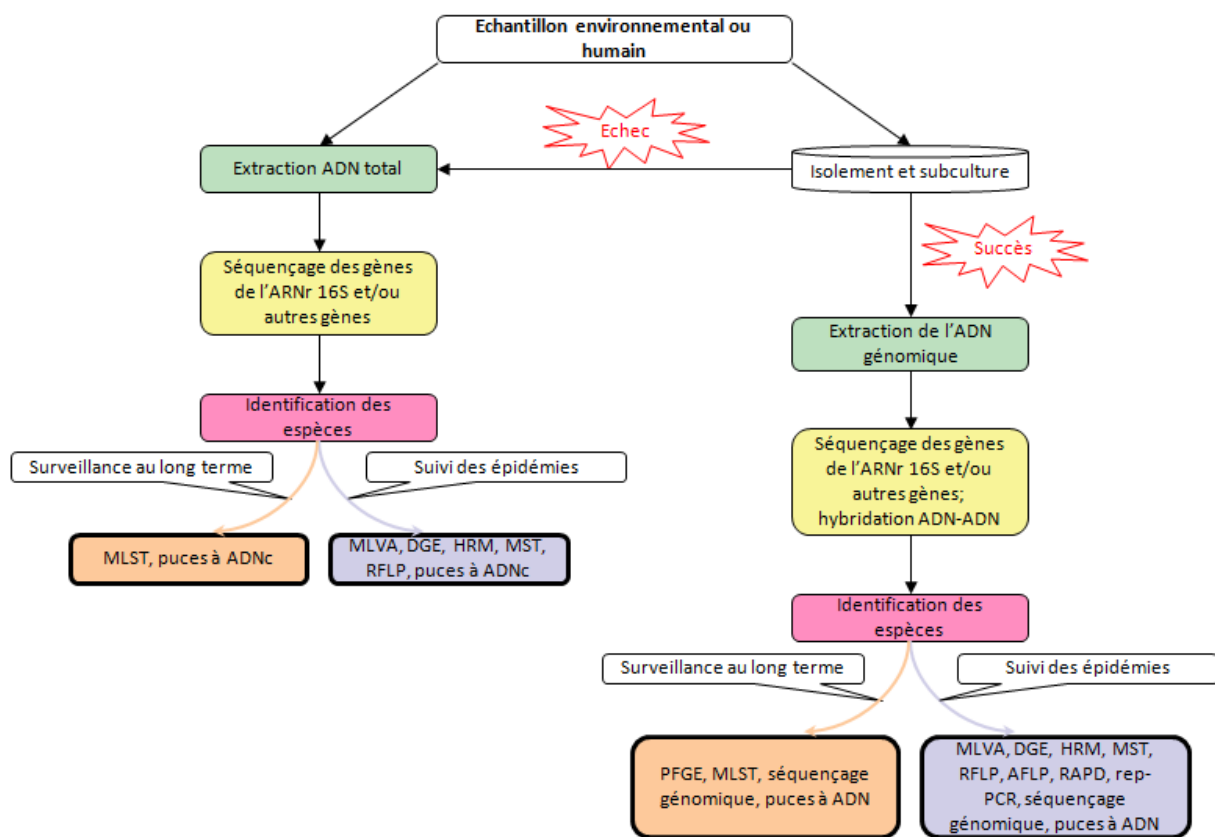


Figure 1-8: Sélection de la méthode appropriée pour le typage des souches bactériennes (d'après Wenjun *et al.*, 2009).

La biodiversité basée sur l'étude d'isolats ne représente qu'une minorité de la diversité totale d'un écosystème et l'estimation de la richesse est largement sous-estimée. Les méthodes culturales sous-estiment donc la diversité microbienne et limitent l'importance écologique des bactéries viables mais non cultivables (« Viable But Non Culturable » ou VBNC) (Torsvik *et al.*, 1998; Malik *et al.*, 2008). Pour palier aux différentes limites de la culture, d'autres méthodes ne nécessitant pas l'isolement des bactéries ont été développées. Parmi ces méthodes figurent des techniques biochimiques et de nombreuses méthodes moléculaires basées sur l'étude des acides nucléiques.

Les méthodes moléculaires font parties des techniques actuelles les plus utilisées pour étudier la biodiversité d'un écosystème (Theron et Cloete, 2000; Morris *et al.*, 2002; Kemp et Aller, 2004; Dorigo *et al.*, 2005; Spiegelman *et al.*, 2005; Gilbride *et al.*, 2006). Ces méthodes sont basées sur l'analyse du patrimoine génétique des organismes présents dans la communauté, que ce soit l'ADN ou l'ARN. Les techniques moléculaires développées sont très variées et la majorité d'entre elles permettent, en association ou pas avec d'autres méthodes, d'accéder à l'identification (à différents niveaux taxonomiques selon la ou les méthodes utilisées) et à la phylogénie des différentes populations présentes dans une communauté microbienne (Amman *et al.*, 1995; Head *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2002; Lopez-Garcia et Moreira, 2008).

L'inconvénient majeur des techniques moléculaires est que bon nombre d'entre elles nécessitent l'utilisation de méthode d'extraction et de purification de l'ADN ainsi que de la PCR (Annexe VI: Polymerase Chain Reaction) ou du clonage dans le but d'amplifier les séquences génétiques désirées. Ces techniques présentent un nombre de biais non négligeables qu'il faut considérer lors d'une étude sur la biodiversité (Annexe VII: Biais dus à l'extraction de l'ADN et à la PCR) (Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008; Rajendhran et Gunasekaran, 2010).

3.2. PRINCIPE DE L'IDENTIFICATION DES LEGIONELLES POUR LE SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE

Les légionelles font l'objet d'une identification de leur genre, espèce et séro groupe dans le cadre de la surveillance réglementaire des concentrations dans les systèmes aquatiques artificiels. Les méthodes utilisées dans cet objectif sont des méthodes culturales basées sur leurs caractères biochimiques pour la détermination du genre et de l'espèce ainsi que des méthodes immunologiques pour la détermination des sérogroupes. Les légionelles sont également identifiées à un niveau taxonomique inférieur à celui de l'espèce. L'identification des sous-espèces et des souches de légionelles est essentielle dans les études épidémiologiques. Ces études ont pour objectif de déterminer l'origine de cas de légionelloses et mettre en évidence les relations de clonalité entre les différents isolats de légionelles.

Au niveau réglementaire, la circulaire n° DGS/SD5C/SD7A/DESUS/2005/323 du 11 Juillet 2005 (Ministre de la Santé et des Solidarités, 2005), relative à la diffusion du guide d'investigation et d'aide à la gestion d'un ou plusieurs cas de légionellose, fixe les conduites à tenir lors de la découverte d'un cas de légionellose (Annexe I: Déclaration des cas de légionellose). La déclaration d'un cas de légionellose implique l'identification du genre, de l'espèce et du séro groupe de l'agent infectieux. Cette déclaration est envoyée aux Agences Régionales de Santé (ARS) qui réalisent en partenariat avec le CNRL et l'InVS une investigation du cas de légionellose détecté. Cette enquête permet d'identifier la source de la contamination, de déterminer le caractère isolé ou communautaire de la maladie et de renseigner les réseaux de surveillance européens. En France, l'identification de cas groupés et des sources de contamination est réalisée par l'analyse des profils de macrorestriction de l'ADN génomique des souches isolées de patients ou de l'environnement par électrophorèse en champ pulsé (« Pulsed Field Gel Electrophoresis » ou PFGE) (Schoonmaker *et al.*, 1992). Cette technique est la méthode de référence utilisée au CNRL. Le typage par électrophorèse

en champ pulsé est long (minimum quatre jours). Un résultat plus rapide (un jour) peut être obtenu par une technique basée sur l'amplification aléatoire (« Arbitrarily Primed PCR » ou AP-PCR) du génome des légionelles (Pruckler *et al.*, 1995). Le pouvoir discriminant de cette méthode étant plus faible (92% contre 98% pour la PFGE), les résultats devront être confirmés par PFGE. Pour permettre un échange européen des données du typage moléculaire, et assurer la surveillance européenne des légionelloses, une technique basée sur le séquençage nucléotidique (« Sequence Based Typing » ou SBT) a été développée par Gaia *et al.* (2005). Cette technique permet l'échange intereuropéen de résultats de séquences via le réseau de surveillance européen ELDSNet, hébergé par EWGLI.

Outre ces méthodes développées pour assurer le suivi réglementaire des cas de légionellose, d'autres techniques ont vu le jour et permettent, selon leurs caractéristiques, de réaliser des suivis épidémiologiques ou écologiques et d'améliorer nos connaissances sur les propriétés fondamentales des légionelles (plasticité génomique, expression phénotypique, diversité fonctionnelle...).

3.3. METHODES D'IDENTIFICATION TAXONOMIQUE POUR DES ETUDES D'ÉCOLOGIE MICROBIENNE

Les légionelles peuvent être identifiées par différentes méthodes qui ciblent plusieurs composés cellulaires et qui présentent différentes résolutions taxonomiques (Figure 1-9). Parmi ces méthodes, on peut différencier :

- les méthodes immunologiques, basées sur la réaction antigènes / anticorps ;
- les méthodes biochimiques, basées sur l'analyse d'un constituant cellulaire et de son activité au sein de la cellule, tel que les protéines ou les acides gras ;
- ou les méthodes moléculaires qui ont pour cible tout ou partie du génome bactérien.

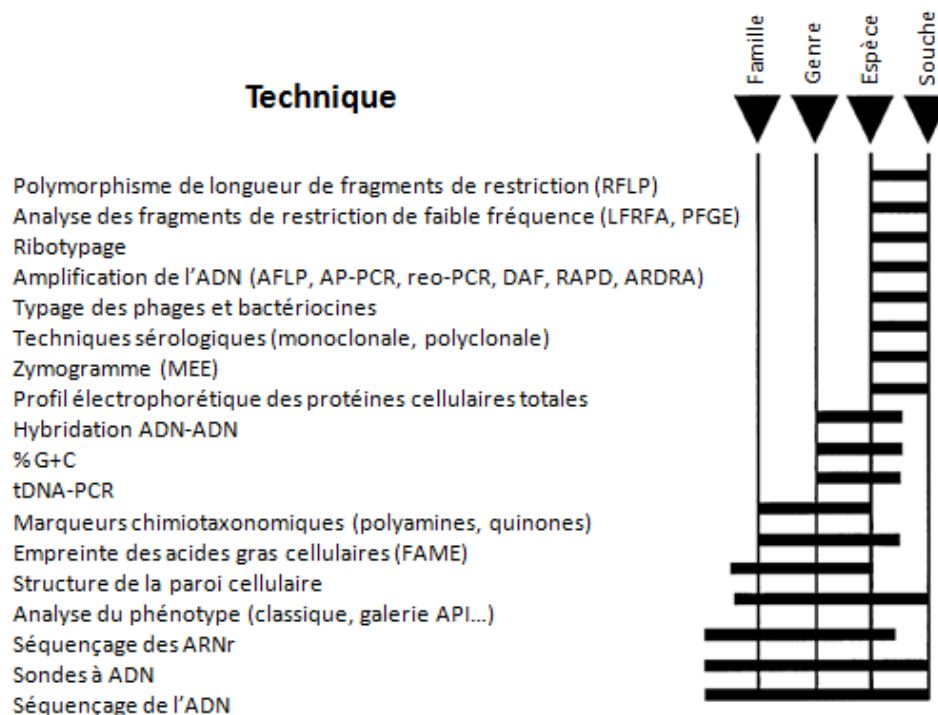


Figure 1-9: Résolution taxonomique de différentes méthodes dont certaines utilisées pour le typage des légionelles (d'après Vandamme *et al.*, 1996).

Les méthodes immunologiques impliquent la réalisation d'une étape de culture. Ces méthodes sont associées à l'identification du genre et de l'espèce des légionelles par les méthodes culturales pour l'identification des sérogroupes. Les méthodes biochimiques sont réalisées avec ou sans étape de culture. Elles présentent l'intérêt majeur de pouvoir associer l'identification à la fonction des organismes présents dans les écosystèmes. Les méthodes moléculaires permettent l'identification des espèces et souches de légionelles directement à partir de l'échantillon brut ou d'isolat bactérien et permettent la détection des micro-organismes non cultivables.

Peu d'étude ont été dédiées au développement de méthodes de typage adaptées à des études écologiques. Dans ce contexte, l'identification des légionelles permet de mieux comprendre la colonisation de différentes niches écologiques par certaines espèces voir certaines souches. L'ensemble des méthodes décrites dans ce rapport sont résumées sur la Figure 1-10 et détaillées dans les paragraphes suivants en abordant les aspects identification taxonomique et pertinence en écologie microbienne.

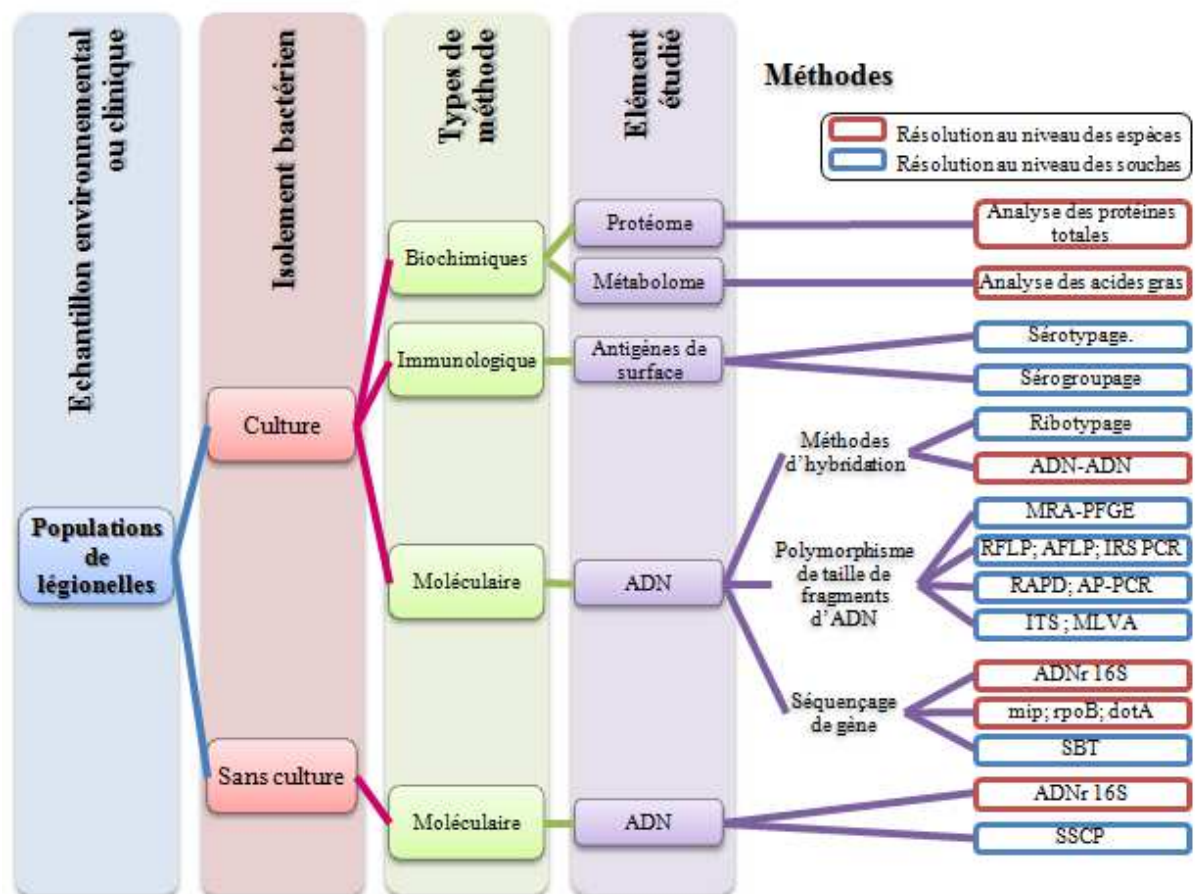


Figure 1-10: Ensemble des méthodes utilisées en écologie ainsi qu'en épidémiologie pour l'identification des espèces et des souches de légionelles.

3.3.1. METHODES IMMUNOLOGIQUES

Les techniques immunologiques sont utilisées en routine dans les laboratoires pour l'identification de l'espèce et du sérotype des légionelles. Les anticorps monoclonaux ou polyclonaux utilisés ciblent des antigènes de surface, à savoir les lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries (Ciesielski *et al.*, 1986). Ce LPS présente une structure particulière chez les légionelles. Elle a été mise en évidence par Sonesson *et al.* (1993). Le LPS des *L. pneumophila* se distingue des autres espèces par sa composition en acides gras (Moss et Dees, 1979; Lambert et Moss, 1989). C'est le plus important déterminant immunologique qui permet la distinction des sérotypes de l'espèce *L. pneumophila* (Wilkinson et Fikes, 1980; Sedgwick et Tilton, 1983). Le LPS est constitué par trois régions distinctes :

- une partie interne, le lipide A hautement conservé ;
- un noyau ou *core* oligosaccharidique ;
- une chaîne polysaccharidique (O) présentant une forte diversité et constituant la région antigénique du LPS. Les sérotypes sont définis par le degré d'O-acétylations de cette chaîne polysaccharidique.

La réaction immunologique des anticorps avec les LPS permet d'identifier les différentes espèces de légionelles et de grouper l'espèce *L. pneumophila* en 15 sérotypes numérotés de 1 à 14 et un groupe appelé sérotype Lansing 3. Elle permet aussi en utilisant huit anticorps monoclonaux différents de subdiviser *L. pneumophila* sérotype 1 en neuf sous-groupes : Knoxville, Philadelphia, Benidorm, France/Allentown, Olda, Oxford, Bellingham, Heysham et Camperdown (Joly *et al.*, 1986; Helbig *et al.*, 1997; Helbig *et al.*, 2002). Un épitope reconnu par l'anticorps MAb 3/1 est lié à une virulence accrue du sérotype 1 : en effet, 85.1 % des *L. pneumophila* sérotype 1 isolées chez des patients sont reconnues par ce MAb (Helbig *et al.*, 2002).

La détection de la réaction positive antigènes / anticorps peut être déterminée :

- par immunofluorescence directe grâce à des immun-sérums de lapin dirigés contre les 50 espèces et les 64 sérotypes de légionelles ;
- par dosage immuno-enzymatique de type ELISA ;
- ou par agglutination de billes de latex couplées à des anticorps spécifiques.

Bien que très utilisées pour l'identification des espèces et des sérotypes de légionelles, ces méthodes ont cependant certaines limites. Des réactions immunologiques croisées avec certaines bactéries ou entre sérotypes ont été mises en évidence et biaisent l'identification par la détection de faux positifs (Chen *et al.*, 1994; Helbig *et al.*, 1994; Jurgens et Fehrenbach, 1995; Ditommaso *et al.*, 2008). Ces méthodes sont utilisées en routine pour l'identification des souches isolées de patients ou de l'environnement. En écologie, pour chaque détermination du genre et de l'espèce d'isolats de légionelle, est généralement associée une identification de leurs sérotypes.

3.3.2. METHODES BIOCHIMIQUES

Les méthodes biochimiques regroupent, entre autres, les méthodes qui se basent sur l'étude des protéines ou des acides gras cellulaires. La métabolomique et le profilage lipidique étudient de manière simultanée toutes les protéines et tous les lipides extraits d'une communauté bactérienne. Ces méthodes permettent essentiellement d'accéder au profil

biochimique d'une communauté entière. Les données sur l'identité des populations et leurs proportions restent cependant limitées. L'avantage majeur de ces techniques est qu'elles permettent (pour certaines) de lier la biodiversité à la fonction des populations au sein de la communauté.

3.3.2.1. ANALYSE DU PROTEOME

Identification taxonomique des légionelles

Lema et Brown (1983) ont développé une méthode d'analyse par électrophorèse des protéines totales sur gel dénaturant de polyacrylamide (« Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis » ou SDS-PAGE) des bactéries appartenant au genre *Legionella*. Cette méthode simple permet une analyse simultanée d'un grand nombre d'isolats. Elle a été testée par Verissimo *et al.* (1996) sur plus de 300 souches bactériennes. Les auteurs ont conclu que cette méthode est utilisable pour l'identification taxonomique des espèces de *Legionella*. Des études menées sur différents genres bactériens ont montré qu'elle présente la même résolution que l'hybridation ADN-ADN (Kerstens et De Ley, 1975; Vauterin *et al.*, 1990).

Les techniques d'analyse du protéome ont fait l'objet de développements technologiques depuis l'arrivée des spectromètres de masse. Ainsi, l'analyse du protéome par MALDI-TOF MS permet une identification rapide après culture de toutes les espèces de légionelles (Moliner *et al.*, 2010; Fujinami *et al.*, 2011; Gaia *et al.*, 2011). Cette méthode est, de plus, concordante avec les outils phylogénétiques tels que le séquençage de l'ADNr 16S ou du gène *mip* (Gaia *et al.*, 2011). Cependant, l'analyse des protéines totales des espèces *L. pneumophila* par spectrométrie de masse ne permet pas la distinction entre les sérogroupes (Gaia *et al.*, 2011).

Application en écologie microbienne

Outre l'identification taxonomique des espèces bactériennes, les méthodes d'analyse du protéome peuvent être utilisées en écologie et présentent des intérêts majeurs dans l'étude de communauté microbienne. La métaprotéomique est une discipline qui, à partir d'un extrait de protéines totales issues d'un écosystème, permet l'identification taxonomique des groupes et espèces présentes ainsi que l'étude de l'activité microbienne en relation avec son environnement (Benndorf *et al.*, 2007). Cette technique a déjà été utilisée pour l'étude fonctionnelle de communautés bactériennes complexes telles que des sols, des eaux marines ou des eaux souterraines (Beranova-Giorgianni, 2003; Kan *et al.*, 2005; Wilmes et Bond, 2006; Benndorf *et al.*, 2007; Maron *et al.*, 2007; Sowell *et al.*, 2011). Par exemple, des analyses de métaprotéome sur des échantillons d'eaux souterraines contaminées par du chlorobenzène ont permis à Benndorf *et al.* (2007) d'identifier deux espèces bactériennes appartenant au genre *Acidovorax* qui ont un rôle dans la biodégradation de ce polluant. Bien que cette technique nécessite certaines améliorations (baisse de la limite de détection, amélioration de la précision de la méthode...), les études récentes montrent son intérêt dans la compréhension complète des assemblages biologiques (Beranova-Giorgianni, 2003).

3.3.2.2. ANALYSE DES ACIDES GRAS CELLULAIRES

Identification taxonomique des légionelles

Les métabolites les plus utilisés pour l'identification bactérienne sont les lipides dont les acides gras phospholipidiques (« PhosphoLipid Fatty Acids » ou PLFA), les esters méthyliques d'acides gras (« Fatty Acids Methyl Ester » ou FAME) et les quinones. Les méthodes d'analyse de ces lipides consistent à extraire et à purifier l'ensemble des lipides puis à les identifier et les quantifier par des méthodes chromatographiques, par spectrométrie de masse ou par résonance magnétique nucléaire (Spiegelman *et al.*, 2005). Sachant que la nature, la combinaison et la distribution des acides gras sont spécifiques d'une espèce bactérienne, par ces méthodes il est possible d'identifier différents groupes bactériens (Spiegelman *et al.*, 2005). De plus, les résultats obtenus par ces méthodes sont en accord avec ceux obtenus par le séquençage du gène de l'ARNr 16S qui est la référence en matière de phylogénie des espèces bactériennes (Kohring *et al.*, 1994; Malik *et al.*, 2008).

Cette méthode a été très utilisée pour l'identification des isolats de légionelles dans les années 1990 (Mayberry, 1984; Marmet *et al.*, 1988; Lambert et Moss, 1989; Jantzen *et al.*, 1993). En 1999, elle a été testée sur l'ensemble des espèces de légionelles connues à cette date. Les auteurs (Diogo *et al.*, 1999) montrent que les espèces appartenant au genre *Legionella* sont identifiables par cette technique à l'exception des légionelles auto-fluorescentes dans le rouge : *L. erythra* et *L. rubrilucens*. Bien que standardisée, cette méthode a trouvé peu d'applications tant en épidémiologie qu'en écologie. Costa *et al.* (2005) reportent l'utilisation de cette méthode pour l'identification de légionelles présentes dans des eaux souterraines. Dans cette étude, l'identification des espèces de légionelles par analyse de leurs acides gras a été complétée par une analyse génomique des souches permettant d'accéder à leur persistance dans le milieu. Cette étude montre le manque d'applicabilité de cette méthode qui se limite à l'identification des espèces.

Application en écologie microbienne

Ces méthodes sont plus généralement utilisées pour générer des profils communautaires permettant de comparer plusieurs communautés entre elles ou d'observer des variations temporelles ou spatiales au sein d'une communauté bactérienne (Malik *et al.*, 2008). Il existe plusieurs avantages aux méthodes de profilage des lipides. Les cellules bactériennes adaptent la composition lipidique de leur membrane en fonction des conditions environnementales. Des informations sur leur statut physiologique sont aussi accessibles par le profilage des lipides (Malik *et al.*, 2008). De même, il est possible d'analyser des marqueurs biochimiques liés à une fonction métabolique de la cellule et de déterminer les fonctions des différentes populations dans leur environnement (Spiegelman *et al.*, 2005). Le profilage de communauté par l'analyse de marqueurs lipidiques permet de comparer la composition de plusieurs communautés bactériennes (Kohring *et al.*, 1994; Spiegelman *et al.*, 2005). Ces méthodes ne sont cependant pas adaptées au profilage de communautés complexes car les acides gras ne sont pas spécifiques d'une population bactérienne et chaque espèce possède plusieurs lipides membranaires (Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008). L'ensemble des acides gras d'une communauté complexe est donc très large et l'analyse des données est rendue compliquée par le grand nombre de données que génèrent ces méthodes (Spiegelman *et al.*, 2005). Ces méthodes nécessitent un équipement onéreux

mais elles restent tout de même rapide et ne nécessitent pas d'étape de culture, les fractions VBNC sont donc prises en compte dans la mesure de la biodiversité (Spiegelman *et al.*, 2005). Les méthodes biochimiques sont, cependant, largement moins utilisées que les méthodes d'identification moléculaire (Theron et Cloete, 2000; Morris *et al.*, 2002; Spiegelman *et al.*, 2005; Rastogi *et al.*, 2011).

3.3.3. METHODES MOLECULAIRES

3.3.3.1. TECHNIQUES D'HYBRIDATION

Identification taxonomique des légionelles

a) Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN fait office de référence pour la définition d'espèce bactérienne (principe de la technique en Figure 1-11) (Rossello-Mora et Amann, 2001; Wenjun *et al.*, 2009). Pour les différentes espèces de légionelles, le pourcentage d'hybridation de l'ADN est supérieur à 75% sauf pour *L. bozeman* qui présente 56 à 77% d'homologie avec les autres espèces (Garrity *et al.*, 2005). La technique d'hybridation ADN-ADN étant délicate et coûteuse, les relations phylogénétiques des espèces appartenant au genre *Legionella* sont établies sur la base du gène de l'ARNr 16S (Fry *et al.*, 1991). Bien que cette méthode soit moins discriminante que l'hybridation ADN-ADN, l'analyse du gène de l'ARNr 16S est utilisée en amont pour sélectionner les souches candidates à une analyse d'hybridation ADN-ADN (Stackebrandt et Goebel, 1994).

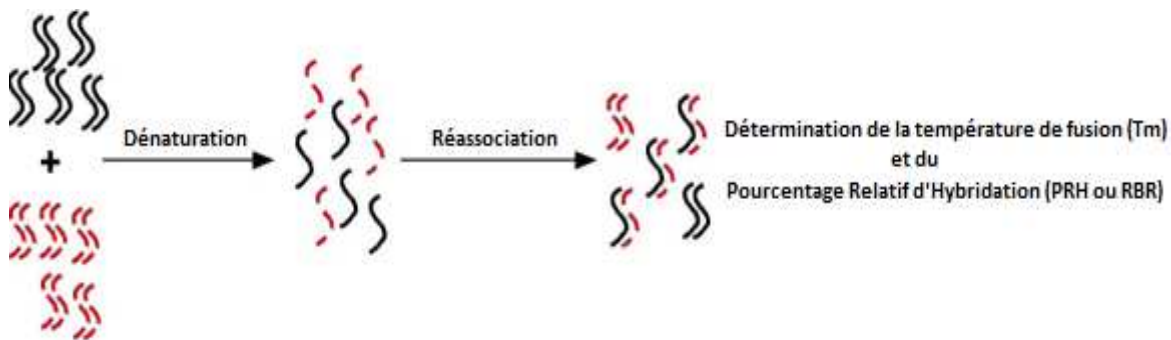


Figure 1-11: Principe des essais d'hybridation ADN-ADN (d'après Rossello-Mora et Amann, 2001).

b) Ribotypage

Le ribotypage consiste à digérer l'ADN total grâce à une enzyme de restriction à sites fréquents (*EcoRI* par exemple), à le faire migrer sur gel d'agarose et à le transférer sur une membrane où il sera hybridé avec des séquences d'ADNr 16S et 23S d'*Escherichia coli* marquée radio-activement au phosphore 32. Les séquences d'ADNr présentant des *loci* hypervariables spécifiques des espèces, les profils de digestion seront spécifiques des espèces (Van Belkum *et al.*, 1996). L'utilisation simultanée de plusieurs sondes d'origines ribosomique et non ribosomique peut permettre une discrimination des souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 (Saunders *et al.*, 1991). Cependant, certaines études de comparaison de méthode de typage moléculaire pour les légionelles ont montré que le ribotypage est moins efficace que les méthodes telles que la RAPD ou l'ITS 16-23S (voir

paragraphe suivants) (Schoonmaker *et al.*, 1992; Salloum *et al.*, 2002). Il semble que cette méthode soit plus efficace pour l'identification de nouvelles espèces que pour des suivis épidémiologiques ou écologiques (Cordevant *et al.*, 2003).

Application des techniques d'hybridation en écologie microbienne

a) Hybridation réciproque

La technique d'hybridation ADN-ADN, principalement utilisée en taxonomie bactérienne, a été adaptée à des études de diversité microbienne. L'hybridation réciproque de l'ADN permet de mesurer le degré de similarité entre plusieurs communautés. Elle est utilisée lorsque l'objectif de l'étude est uniquement de comparer plusieurs communautés entre elles et de mesurer leur degré de similarité (Lee et Fuhrman, 1990, 1991; Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005).

Le principe de la méthode est que l'ADN d'une communauté A est digéré par des enzymes de restriction et marqué radio-activement. En parallèle, l'ADN de la communauté B est dénaturé et fixé à une membrane pour constituer la cible. L'ADN digéré et marqué de la communauté A est ensuite mis en contact avec la membrane support de la communauté B pour que l'ADN de la communauté A s'hybride avec celui de la communauté B (Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005). Le degré de similarité entre les deux communautés d'ADN est corrélé au taux d'hybridation entre l'ADN des deux communautés. La méthode d'hybridation réciproque de communauté donne des informations sur la ressemblance de deux communautés mais aussi sur la richesse et l'uniformité des échantillons (c'est à dire sur le nombre de populations présentes et sur leur proportion relative) (Lee et Fuhrman, 1990; Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005). Cette méthode donne des résultats concluant lorsque les deux communautés sont très proches ou très éloignées mais les résultats sont difficilement interprétables lorsque les communautés bactériennes sont moyennement semblables (Spiegelman *et al.*, 2005).

L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle ne permet que d'avoir des informations relatives aux deux échantillons. Aucune description individuelle des communautés ne peut être obtenue par cette technique. De plus, le type d'informations générées est limité, la composition des communautés et l'abondance des populations restent inconnue. Seules la richesse et la proportion des populations entre les deux communautés peuvent être obtenues (Lee et Fuhrman, 1990, 1991; Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005). Dans une étude de biodiversité, cette méthode reste donc limitée et est essentiellement utilisée pour comparer le degré de similarité entre deux échantillons et surveiller les modifications majeures d'un écosystème (Lee et Fuhrman, 1990, 1991; Griffiths *et al.*, 1997).

b) Hybridation in situ de sondes fluorescentes

L'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (« Fluorescent *In Situ* Hybridization » ou FISH) permet de mesurer simultanément trois paramètres de biodiversité sur des échantillons environnementaux bruts ou filtrés (Amman *et al.*, 1995; Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005; Gilbride *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2008) :

- la présence de différents groupes taxonomiques ;
- l'abondance relative des groupes taxonomiques ;
- la distribution spatiale *in situ* des groupes taxonomiques.

Cette méthode est basée sur l'hybridation de sondes oligonucléotidiques courtes (15 à 25 paires de base) et fluorescentes sur l'ARN ribosomique 16S des différentes populations d'une communauté bactérienne. Les sondes oligonucléotidiques utilisées ciblent l'ARNr 16S des populations à différentes échelles taxonomiques selon l'objectif de l'étude. Plusieurs sondes peuvent être utilisées simultanément pour détecter différentes populations, seulement si leurs fluorochromes possèdent des caractéristiques spectrales différentes. Généralement, l'ensemble des sondes utilisées simultanément comprend des sondes spécifiques du domaine *Bacteria* et d'autres spécifiques de groupes taxonomiques inférieurs tels que le phylum, l'espèce ou la souche (Dorigo *et al.*, 2005; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008).

La méthode FISH a souvent été utilisée en écologie microbienne aquatique pour évaluer les variations spatio-temporelles de plusieurs groupes phylogénétiques dominants dans les environnements étudiés (Pernthaler *et al.*, 1998; Bockelmann *et al.*, 2000; Masin *et al.*, 2003; Sekar *et al.*, 2004). Elle a permis de corrélérer la dynamique de certaines populations avec différents facteurs physico-chimiques et d'identifier des micro-organismes inconnus à ce jour (Pernthaler *et al.*, 1998; Bockelmann *et al.*, 2000). Pernthaler *et al.* (1998) montrent, notamment par la méthode FISH, que la stabilité apparente de l'abondance totale du bactérioplancton marin peut masquer des fluctuations très dynamiques dans les populations bactériennes.

c) Puce à ADN

La technologie des puces à ADN est très répandue, ses domaines d'application sont très larges et intéressent de nombreux secteurs tels que la génomique fonctionnelle, le génotypage, le diagnostic clinique ou encore l'analyse de structure bactérienne. En écologie aquatique, cette technologie est très appliquée pour mesurer la biodiversité et la corrélérer à la diversité fonctionnelle des échantillons (Wu *et al.*, 2008) ou pour identifier les populations dominantes, déterminer leur dynamique spatio-temporelle et l'influence de facteurs physico-chimiques (Zwart *et al.*, 2003 ; Lindstrom *et al.*, 2005; Tsiamis *et al.*, 2008 ; Mayali *et al.*)

Les puces à ADN sont des surfaces (de verre, polymère ou silicium) sur lesquelles sont fixées des sondes oligonucléotidiques capables de s'apparier à des séquences d'ADN complémentaires. L'ADN à tester, marqué par un fluorochrome est mis en contact avec la puce à ADN. Un signal fluorescent est émis si l'ADN s'hybride par complémentarité à une sonde (Spiegelman *et al.*, 2005; Gilbride *et al.*, 2006). Tous les micro-organismes présents dans l'échantillon, les bactéries viables et cultivables, viables mais non cultivables et mortes sont susceptibles d'être mesurés par les puces à ADN, à condition que chacun des micro-organismes soient représentés par une sonde (Greer *et al.*, 2001).

3.3.3.2. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE TAILLE DES FRAGMENTS D'ADN

Identification taxonomique des légionelles

Les méthodes basées sur le polymorphisme de taille de fragments d'ADN consistent à amplifier l'ADN génomique (génome entier ou portion de génome) et à les séparer selon leur taille par électrophorèse. Le nombre et la taille des fragments définissent un profil

électrophorétique spécifique des souches. Plusieurs approches ont été développées parmi lesquelles (i) la digestion par des enzymes de restriction du génome bactérien entier ; (ii) l'amplification aléatoire du génome bactérien ou encore (iii) l'amplification sélective de portions de génome. Ces différentes méthodes sont détaillées dans les paragraphes suivant.

a) Digestion de l'ADN génomique

Ces méthodes présentent toutes un fort pouvoir discriminant, comparable à celui de l'électrophorèse en champs pulsé.

- Le typage des légionelles par **macrorestriction de l'ADN suivie d'une électrophorèse en champ pulsé** (« Macro Restriction Analysis - Pulsed Field Gel Electrophoresis » ou MRA-PFGE) est une technique développée par Schwartz et Cantor (1984). Cette méthode, qui permet la séparation de larges fragments d'ADN, a été adaptée au génome des légionelles par Schoonmaker *et al.* (1992). Son principe consiste en une digestion de l'ADN par une enzyme de restriction générant des fragments d'ADN de haut poids moléculaire suivie d'une électrophorèse en champ pulsé. Elle présente un très fort pouvoir discriminant ainsi qu'une très bonne concordance épidémiologique. Sa reproductibilité intra-gel est excellente, cependant un manque de reproductibilité inter-gel a été observé (Schoonmaker *et al.*, 1992; Pruckler *et al.*, 1995; Riffard *et al.*, 1998b; De Zoysa et Harrison, 1999; Fry *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 1999b; Jonas *et al.*, 2000; Drenning *et al.*, 2001; Scaturro *et al.*, 2005; Casini *et al.*, 2008b). De même son utilisation est limitée par le coût du matériel nécessaire ainsi que par le manque de rapidité de la méthode (Montanaro-Punzengruber *et al.*, 1999; Wiese *et al.*, 2004). Elle a été largement utilisée dans de nombreuses études et est utilisée comme méthode de référence au CNRL (Montanaro-Punzengruber *et al.*, 1999; Sabria *et al.*, 2001; Amemura-Maekawa *et al.*, 2005; Aurell *et al.*, 2005; Ragull *et al.*, 2007; Casini *et al.*, 2008a).
- La méthode basée sur le **polymorphisme de longueur de fragments de restriction** (« Restriction Fragment Length Polymorphism » ou RFLP) consiste à digérer l'ADN des légionelles par une enzyme de restriction puis à amplifier les fragments générés et à les séparer par une électrophorèse. Ils sont ensuite transférés sur une membrane de nylon après leur dénaturation puis visualisés à l'aide de sondes par la technique du Southern Blot (Saunders *et al.*, 1990; Saunders *et al.*, 1991; De Zoysa et Harrison, 1999; Ko *et al.*, 2003). Cette méthode permet une identification des espèces de *Legionella* ainsi que des sous-populations de *L. pneumophila*. Elle a été fréquemment utilisée pour des études épidémiologiques (Joseph *et al.*, 1994; Joseph *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 2007b). La méthode RFLP présente un pouvoir discriminant comparable à celui de la PFGE (De Zoysa et Harrison, 1999; Ko *et al.*, 2003).
- L'analyse du **polymorphisme de taille de fragments amplifiés** (« Amplified Fragment Length Polymorphism » ou AFLP) est une méthode qui permet une discrimination taxonomique au niveau des souches de légionelle. Cette méthode consiste à digérer l'ADN génomique par deux enzymes de restriction. Des adaptateurs oligonucléotidiques sont liés aux extrémités des fragments d'ADN et servent de cibles aux amorces complémentaires utilisées pour amplifier un sous-ensemble des fragments de digestion. La diversité génomique des souches est visualisée par la taille des fragments d'ADN générés par la double digestion (Fry *et al.*, 1999; Fry *et al.*,

2000; Jonas *et al.*, 2000; Scaturro *et al.*, 2005; Chiarini *et al.*, 2008). Cette méthode a été développée par KeyGene® (Hollande) (Vos *et al.*, 1995), une compagnie privée de biotechnologies qui a déposé des droits de propriété sur la technologie. L'AFLP a été la première méthode standardisée par EWGLI au niveau international pour le typage génomique de *L. pneumophila* (Fry *et al.*, 2002). Son utilisation est très répandue en épidémiologie (Perola *et al.*, 2002; Perola *et al.*, 2005; Chiarini *et al.*, 2008; Den Boer *et al.*, 2008).

- La **PCR basée sur des sites de restriction rares** (« Infrequent Restriction Site PCR » ou IRS PCR) est une méthode de typage moléculaire basée sur le même principe que l'AFLP. La différence réside dans l'emploi d'enzymes de restriction différentes qui coupent l'ADN avec une fréquence élevée et rare alors que les enzymes utilisées pour l'AFLP génèrent un nombre plus important de fragments. L'analyse des profils électrophorétiques suite à l'IRS PCR est moins fastidieuse que par l'AFLP. La résolution taxonomique de cette méthode est au niveau de la souche (Mazurek *et al.*, 1996). Elle présente les avantages d'être rapide, d'emploi aisé et ne nécessitant aucun équipement spécialisé (Riffard *et al.*, 1998b). Elle n'a cependant pas été largement utilisée, que ce soit pour des études épidémiologiques ou à but écologique. Seules quelques publications font mention de l'utilisation de cette technique pour l'identification des souches de légionelles (Lo Presti *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2006).

b) Amplification aléatoire de l'ADN génomique

- La technique de biologie moléculaire basée sur le **polymorphisme de l'ADN amplifié aléatoirement** (« Random Amplified Polymorphic DNA » ou RAPD) est une technique produisant un profil génétique spécifique des souches (Williams *et al.*, 1990; Sakallah *et al.*, 1995; Bansal et McDonell, 1997; Lo Presti *et al.*, 1998; Zeybek *et al.*, 2009). L'amplification de l'ADN est réalisée à l'aide d'une amorce unique qui se fixe sur de multiples sites de l'ADN. L'amorce utilisée est une séquence définie de manière arbitraire d'environ 10 nucléotides. Si les deux sites d'hybridation de l'amorce sont suffisamment proches, l'amplification PCR est possible et conduit à des fragments de 300 à 4000 pb. L'intérêt de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas de connaissances préalables sur le génome du micro-organisme étudié. La RAPD est une méthode simple et rapide mais le caractère aléatoire de l'amplification induit une faible reproductibilité. Cependant, elle peut présenter un fort pouvoir discriminant si plusieurs amorces sont utilisées simultanément (Lo Presti *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 1999a).
- L'**amplification par des amorces arbitraires** (« Arbitrarily Primed PCR » ou AP-PCR) est une méthode dérivée de la RAPD. La différence entre ces deux méthodes réside dans les cycles d'amplification de l'ADN. L'amplification par des amorces arbitraires consistent en deux cycles d'amplification à faible conditions de stringence suivie d'une troisième amplification dans des conditions fortement stringentes (Welsh et McClelland, 1990). Comme la RAPD, cette méthode présente un manque de reproductibilité (Jonas *et al.*, 2000).

c) Amplification sélective de portions de génome

- Les méthodes basées sur les **espaces intergéniques 16S-23S** (« Intergenic Transcribed Spacer 16S-23S » ou ITS 16S-23S) sont très utilisées pour l'identification des espèces et des sous-espèces de légionelle (Hookey *et al.*, 1995; Riffard *et al.*, 1998a; Salloum *et al.*, 2002; Grattard *et al.*, 2006). Ces méthodes reposent sur l'amplification sélective à l'aide d'amorces spécifiques des régions localisées entre le gène codant pour l'ARNr 16S et celui codant pour l'ARNr 23S. Les séquences intergéniques présentent plus de variabilité que les gènes des ARNr. En effet, ces séquences ne codant pour aucune fonction, la pression de sélection qui leur est associée est faible, générant un grand polymorphisme. Ce polymorphisme se manifeste par une variation dans la longueur de l'espace intergénique. Cette méthode est rapide et simple ; et depuis l'optimisation réalisée par Riffard *et al.* (1998a) sur le choix des amorces utilisées, elle présente un fort pouvoir discriminant permettant d'identifier l'ensemble des espèces de légionelle. L'amplification peut être suivie d'une restriction enzymatique afin d'obtenir des profils encore plus discriminants (Fry et Harrison, 1998; Riffard *et al.*, 1998a).
- Des méthodes basées sur l'**espace intergénique des gènes 23S et 5S** ont également été développées. Elles permettent une discrimination au niveau de l'espèce et au niveau de la souche pour *L. pneumophila* (Grattard *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009).
- Une autre méthode basée sur l'amplification sélective de portions du génome des légionelles permet une discrimination de l'espèce *L. pneumophila* au niveau de la souche. L'**analyse de la variabilité du nombre de séquences répétées en tandem sur plusieurs locus** (« Multiple-locus variable-number tandem repeat (VNTR) analysis » ou MLVA) consiste à amplifier sélectivement huit séquences minisatellites appartenant au génome des légionelles puis à analyser le polymorphisme de leur taille par électrophorèse capillaire ou sur gel d'agarose. Les séquences minisatellites (ou VNTR) présentent un polymorphisme de taille dû au nombre variable, selon les souches, de séquences répétées en tandem (Pourcel *et al.*, 2003; Pourcel *et al.*, 2007; Nederbragt *et al.*, 2008). Cette méthode, très discriminante, permet l'identification rapide d'un grand nombre d'isolats et a montré une bonne applicabilité pour les suivis épidémiologiques (Sobral *et al.*, 2011) ainsi que pour l'identification de nouvelle souche de *L. pneumophila* (Visca *et al.*, 2011). Par une approche polyphasique, associée à la méthode SSCP (voir § 3.3.3.3), Kahlisch *et al.* (2010) ont identifié les populations de *L. pneumophila* présentes dans un réseau d'eau potable sans culture préalable avec une résolution taxonomique au niveau de la souche.

Application des méthodes d'analyse du polymorphisme de taille des fragments d'ADN en écologie microbienne

Parmi les méthodes décrites précédemment, seule l'analyse du **polymorphisme de l'ADN amplifié aléatoirement** (RAPD) a été utilisée sur l'ADN total d'une communauté microbienne. Son utilisation génère un profil génétique spécifique des communautés microbiennes (Franklin *et al.*, 1999; Wikstrom *et al.*, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005). Elle n'est cependant pas applicable pour les communautés bactériennes complexes car les profils qui en résulte possèdent un nombre de bandes trop élevé ce qui rend l'interprétation du gel d'électrophorèse inexploitable (Franklin *et al.*, 1999; Spiegelman *et al.*, 2005).

Franklin *et al.* (1999) utilisent la technique RAPD pour comparer des communautés microbiennes aquatiques entre elles et mesurer l'impact des facteurs environnementaux sur celles-ci. D'autres études, telles que les études de Wilkinson *et al.* (1990) et Radl *et al.* (2005) ont pour objectif la détermination de l'effet de différents polluants sur des communautés microbiennes d'eau ou de sédiment. Ils montrent notamment que le trinitrotoluène (TNT) et une hormone de synthèse, le trenbolone n'ont pas d'effet sur la composition microbienne et donc n'affecte pas la sélection naturelle dans ces écosystèmes.

L'avantage majeur de cette méthode est qu'aucune information préalable sur les séquences cibles n'est nécessaire puisque l'amorce utilisée est créée de manière arbitraire (Spiegelman *et al.*, 2005). La RAPD permet donc d'analyser des communautés bactériennes pour lesquelles on dispose de peu d'informations. De plus, cette méthode rapide et simple ne nécessite pas d'étape de culture, toutes les fractions bactériennes (vivantes et cultivables, vivantes mais non cultivables, mortes) sont donc prises en compte dans l'analyse (Franklin *et al.*, 1999; Wikstrom *et al.*, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005). Cependant la RAPD présente des inconvénients qui limitent son utilisation en écologie bactérienne. En effet, les fragments d'ADN amplifiés sont des fragments ayant de multiples origines sur les génomes bactériens, aucune information sur ces fragments n'est donc disponible. L'identification des différentes populations présentes dans une communauté bactérienne n'est pas envisageable à l'issue de la RAPD (Franklin *et al.*, 1999; Spiegelman *et al.*, 2005). La RAPD est une méthode qui a peu de succès pour des études de diversité aquatique. Les études de caractérisation de communautés réalisées par cette méthode (Franklin *et al.*, 1999; Wikstrom *et al.*, 2000; Radl *et al.*, 2005) démontrent sa rapidité et sa simplicité mais elles soulignent également le manque d'information sur l'identification des bactéries et l'impossibilité de compléter la technique par des méthodes complémentaires.

3.3.3.3. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE LA CONFORMATION DE L'ADN

Application en écologie microbienne

L'analyse du polymorphisme de la conformation de l'ADN simple brin (« Single Strand Conformation Polymorphism » ou SSCP) est une méthode qui ne permet pas l'identification des espèces et souches de légionelles en soit, mais elle permet de mesurer le degré de diversité de différentes populations dans un échantillon sans culture préalable (Calvo-Bado *et al.*, 2003; Wery *et al.*, 2008; Kahlisch *et al.*, 2010; Parthuisot *et al.*, 2010). Cependant, associée à des méthodes de séquençage de l'ADN contenu dans les bandes électrophorétiques obtenues par SSCP, l'identification des espèces ou souches de légionelles est rendue possible.

Cette technique permet de séparer différents fragments d'ADN d'un échantillon ayant la même taille mais qui possèdent des séquences d'acide nucléique différentes. Le principe est le suivant : des gènes sont amplifiés à partir d'extrait d'ADN total, une dénaturation de l'ADN (95 °C) suivie d'une renaturation rapide (0 °C) sépare les ADN doubles brins en simples brins et crée des structures d'ADN secondaires spécifiques pour chaque séquence d'ADN. Les fragments d'ADN de différentes structures sont séparés ensuite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou par électrophorèse capillaire (CE-SSCP). Selon les gènes cibles utilisés, différentes populations bactériennes peuvent être étudiées et plusieurs résolutions taxonomiques peuvent être atteintes.

Par l'amplification sélective du gène de l'ARNr 16S des légionelles (utilisation d'amorces spécifiques), Parthuisot *et al.* (2010) ont suivi leur dynamique spatio-temporelle au sein d'une rivière et ont mis en évidence une forte diversité des espèces de légionelles dont les membres majoritaires sont des souches non cultivables. Une étude semblable a été menée sur de l'eau de circuit de refroidissement d'une tour aéroréfrigérante en France (Wery *et al.*, 2008). Les principaux résultats de cette étude montrent que la dynamique des légionelles ne semble pas être liée à la dynamique des autres membres bactériens majoritaires. Dans les conditions de l'étude, les observations ont également montré que la diversité des espèces de légionelles est affectée par les événements de prolifération de l'espèce *L. pneumophila*.

3.3.3.4. SEQUENÇAGE DE L'ADN

Identification taxonomique des légionelles

a) Typage basé sur le séquençage de sept gènes

En complément de la PFGE, une méthode de typage basée sur le séquençage (« Sequence Based Typing » ou SBT) est utilisée au CNRL pour l'identification des souches de *L. pneumophila*. Elle consiste à analyser le polymorphisme nucléotidique de sept gènes, de virulence et de ménage, appartenant au génome des légionelles (Gaia *et al.*, 2005). Cette méthode est utilisée par le réseau de surveillance européen des infections à légionelles. Une base de données est disponible sur internet (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionellasbt/php/sbthomepage.php>). Son utilisation est largement répandue et permet une discrimination des légionelles à un niveau taxonomique inférieur à l'espèce (Amemura-Maekawa *et al.*, 2005; Aurell *et al.*, 2005; Perola *et al.*, 2005; Casini *et al.*, 2008a; Edwards *et al.*, 2008).

b) Séquençage des gènes mip, rpoB et dotA

L'analyse du polymorphisme des séquences des gènes *mip*, *rpoB* et *dotA* sont des méthodes permettant de discriminer les légionelles au niveau de l'espèce (Ratcliff *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 2003; Costa *et al.*). Elles consistent à amplifier par PCR les gènes d'intérêts puis à les séquencer et à analyser les variations nucléotidiques entre les différentes souches testées. Le gène *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) code pour une protéine jouant un rôle essentiel dans le cycle intracellulaire des légionelles (Ratcliff *et al.*, 1998) et impliquée dans la virulence des souches (Cianciotto, 2001). Le gène *rpoB* est un gène de ménage codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase (Ko *et al.*, 2003; Aurell *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2005). Le gène *dotA* (*defect in organelle trafficking*) code pour une protéine impliquée dans la virulence des souches, nécessaire à la croissance intracellulaire dans les macrophages (Costa *et al.*, 2005; Yanez *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2010).

Une base de données mise en place par l'Agence de Protection de la Santé du Royaume Uni (« Health Protection Agency » ou HPA) basée sur le séquençage du gène *mip* est disponible et permet l'identification rapide des différentes espèces de légionelles (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/mip/mip_id.cgi).

c) Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S est une méthode largement utilisée pour l'identification des espèces appartenant au genre *Legionella* (Fry *et al.*, 1991; Hookey *et al.*, 1996; Lo Presti *et al.*, 2001). Ce gène est utilisé comme référence pour l'analyse des liens phylogénétiques entre espèces. Cependant, cette méthode est peu utilisée en épidémiologie. Ces méthodes peuvent être complétées par une digestion enzymatique post-amplification remplaçant ainsi l'étape de séquençage des fragments d'ADN par une électrophorèse.

Application en écologie microbienne

Différentes études reportant l'utilisation du séquençage de l'ADNr 16S en écologie ont été publiées (Sheehan *et al.*, 2005; Wullings et Van der Kooij, 2006). Le séquençage du gène de l'ARNr 16S a été utilisé pour l'étude de la diversité des espèces de légionelles sans étapes de culture préalable. Par l'utilisation d'amorces spécifiques du genre *Legionella*, les auteurs ont pu analyser, par clonage-séquençage ou pyroséquençage de l'ADNr 16S, la diversité des espèces de légionelles dans différents environnements et mesurer les impacts anthropogéniques sur ces populations (Sheehan *et al.*, 2005; Wullings et Van der Kooij, 2006; Carvalho *et al.*, 2007; Wery *et al.*, 2008). Les résultats de ces études montrent la grande diversité des légionelles non cultivables dans les eaux douces (Wullings et Van der Kooij, 2006) et suggèrent, par exemple, que la salinité et l'anthropisation des milieux favorisent la diversité des espèces de *Legionella*, tandis que l'eau douce non polluée semble sélectionner l'espèce *L. pneumophila* (Carvalho *et al.*, 2007).

Le séquençage du gène de l'ARNr 16S est également très utilisé pour l'analyse de l'ensemble des populations microbiennes d'un écosystème. Dans ce cadre, cette méthode relève de la métagénomique et consiste à amplifier puis à séquencer les ADNr 16S de l'ensemble des individus d'un écosystème. Les séquences sont analysées par comparaison avec des bases de données et permettent l'identification des groupes ou espèces bactériennes.

3.4. CONCLUSIONS

L'identification des légionelles au niveau taxonomique de l'espèce et de la souche est indispensable tant en épidémiologie qu'en écologie. Le choix de la méthode d'identification est primordial et doit être réfléchi en amont de l'étude.

Les méthodes de typage sont essentielles pour comprendre l'épidémiologie des infections puisqu'elles permettent d'identifier les souches responsables de cas de légionellose épidémiques, endémiques ou sporadiques (Visca *et al.*, 1999). Ces techniques permettent : (i) l'identification de la source de l'infection, (ii) la distinction entre les isolats de *Legionella*, (iii) la distinction entre les isolats cliniques et environnementaux. Les méthodes de typage des micro-organismes peuvent permettre de relier leur diversité génétique avec des propriétés biologiques telles que la pathogénicité, la virulence ou encore la résistance à des médicaments (van Belkum *et al.*, 2001).

En écologie microbienne, l'identification des organismes permet à la fois d'étudier la structure des écosystèmes mais aussi d'accéder à l'activité et à la fonction des bactéries dans leur environnement (Morris *et al.*, 2002; Xu, 2006). L'écologie se focalise

principalement sur deux domaines d'étude : (i) la diversité microbienne, qui inclue la quantification et l'identification des micro-organismes dans divers habitats ; et (ii) l'activité microbienne qui correspond à leur fonction dans leur environnement et comment cette activité s'inscrit dans la diversité et dans les cycles biogéochimiques des écosystèmes.

La mesure de tous ces paramètres est souvent difficile et nécessite l'emploi de plusieurs méthodes combinées. La qualité de l'échantillon initial est un paramètre déterminant dans le choix des méthodes et peut rendre la mesure de la biodiversité biaisée. La quantité et la qualité des informations sur la biodiversité d'un échantillon sont directement liées aux avancées technologiques en matière de détection et de quantification des micro-organismes.

Les méthodes microbiologiques basées sur la culture des échantillons ont été le point de départ des études de biodiversité. Cependant, la non-cultivabilité de la majorité des bactéries limite l'intérêt de la culture dans cette discipline. Aujourd'hui, les méthodes moléculaires couplées ou non à des méthodes permettant de déterminer les fonctions des micro-organismes dans leur écosystème constituent des méthodes de choix en écologie bactérienne. Le choix de la méthode est essentiellement lié à l'objectif de l'étude et au type de résultats désirés. En effet, les méthodes décrites précédemment aboutissent à des résultats différents. Certaines sont très utilisées pour mesurer la similarité et comparer plusieurs échantillons, notamment dans l'objectif de mesurer des variations spatio-temporelles ou l'influence des conditions environnementales. D'autres méthodes permettent d'obtenir une empreinte de la communauté microbienne qui représente à la fois la diversité et l'abondance des populations. Elles permettent de déterminer rapidement la diversité générale de l'échantillon et d'étudier la dynamique de la communauté. Ces méthodes peuvent être couplées à des méthodes plus lourdes d'identification des populations par séquençage. La métagénomique permet d'obtenir directement la diversité d'un échantillon et les différentes espèces qui composent l'écosystème. De plus, pour certaines, elles permettent de lier la diversité des populations avec leur fonction dans l'écosystème.

4. ECOLOGIE DES LEGIONELLES

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement aquatique (Fliermans *et al.*, 1981). Elles peuvent être présentes dans les milieux aquatiques naturels tels que les eaux de surface, les lacs et les cours d'eau mais aussi dans les milieux aquatiques artificiels : système de distribution d'eau potable, piscine thermale, TAR (Ortiz-Roque et Hazen, 1987; Verissimo *et al.*, 1991; Wullings et Van der Kooij, 2006; Parthuisot *et al.*, 2010)... La majorité des espèces du genre *Legionella* ont été isolée uniquement à partir d'environnements aquatiques. Il semble que les humains soient des hôtes accidentels de cette bactérie (Edelstein et Cianciotto, 2006; Garduno, 2007).

Dans ce chapitre, consacré à l'écologie des légionelles, seront abordés (i) leur mode de vie, à la fois dans la phase eau et dans la phase biofilm ; (ii) leur présence dans les environnements aquatiques naturels et artificiels ; ainsi que (iii) les relations que ce genre bactérien entretient avec son environnement abiotique et biotique. Un sous-chapitre sur les réseaux trophiques et les mécanismes de régulation des écosystèmes permettra d'élargir le sujet sur l'écologie des légionelles.

4.1. MODE DE VIE PLANCTONIQUE ET SESSILE

4.1.1. CYCLE DE VIE

Dans l'environnement aquatique, les légionelles sont des parasites intracellulaires des amibes, il semble qu'elles ne possèdent pas la capacité de se multiplier en leur absence (Rowbotham, 1980; Fields, 1993; Neumeister *et al.*, 1997; Murga *et al.*, 2001; Borella *et al.*, 2005; Mampel *et al.*, 2006). Le cycle de vie intracellulaire des légionelles a été caractérisé à la fois dans des cellules de protozoaires et de macrophages (Fields *et al.*, 2002). Les légionelles pénètrent dans les amibes ou les macrophages par phagocytose. Elles résident dans un unique phagosome et développent deux stratégies empêchant sa dégradation : (i) l'inhibition de la fusion du phagosome avec les lysosomes, ou (ii) l'inhibition de l'acidification du phagosome (Horwitz et Silverstein, 1980; Horwitz, 1983; Horwitz et Maxfield, 1984). Dans le phagosome, les légionelles se multiplient avant de lyser leur cellule hôte et être libérées dans l'environnement de manière libre ou dans des vésicules (Molofsky et Swanson, 2004; Garduno, 2007) (Figure 1-12).

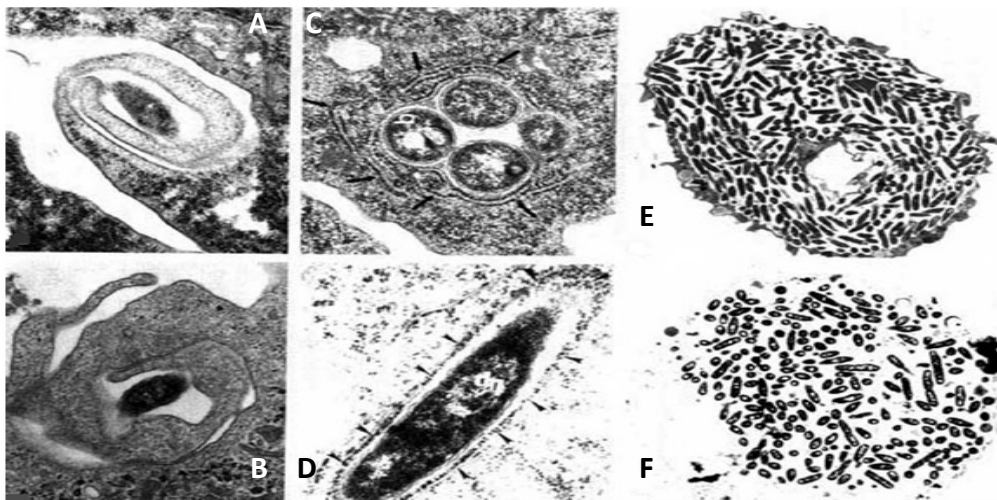


Figure 1-12: Infection d'*Acanthamoebae polyphaga* (en haut) et d'un macrophage (en bas) par *L. pneumophila* en microscopie électronique à transmission (d'après Molmeret *et al.*, 2004).

(A) et (B) : phagocytose par enroulement ; (C) et (D) : formation du phagosome ; (E) et (F) : étapes tardives de l'infection.

Le cycle de vie des légionelles consiste donc en au moins deux phases (Figure 1-13) où s'expriment différents phénotypes (Molofsky et Swanson, 2004; Garduno, 2007).

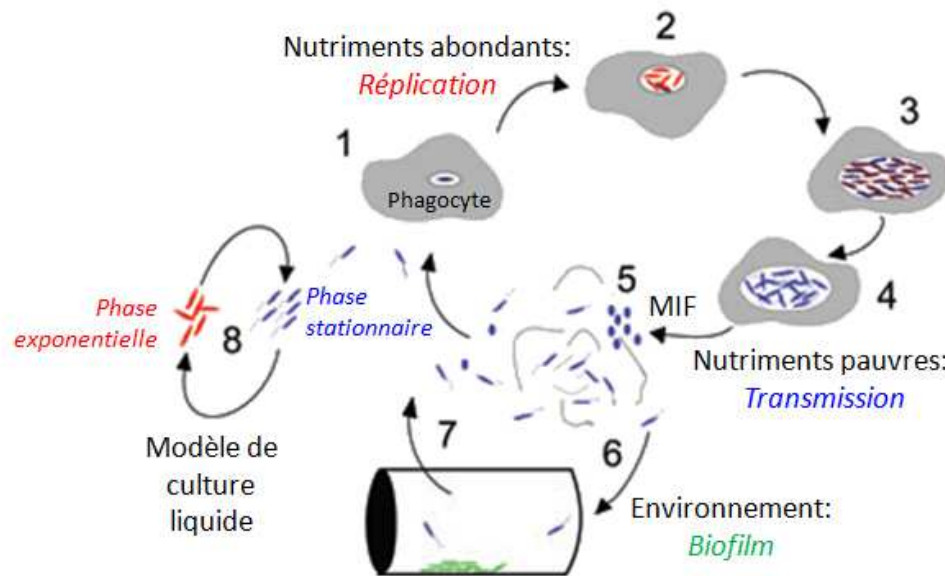


Figure 1-13: Cycle de vie de *L. pneumophila* (d'après Molofsky et Swanson, 2004).

Etudes réalisées en laboratoire qui supportent le modèle suivant du cycle de vie des légionelles dans l'environnement aquatique : (1) La forme planctonique de *L. pneumophila* en phase transmissive est ingérée par des cellules phagocytaires (amibes ou macrophages) et forme une vacuole la protégeant de la digestion lysosomale. (2) Quand les conditions sont favorables (nutriments abondants), la bactérie réprime les traits de transmission et active les voies favorisant la réplication. (3) Lorsque les conditions dans le compartiment de réplication se détériorent, les cellules bactériennes stoppent leur division cellulaire et expriment des traits qui favorisent la survie dans l'environnement et la transmission vers un nouvel hôte phagocytaire. (4) Après une période prolongée, les bactéries expriment le phénotype de la forme intracellulaire mature (« Mature Intracellular Form » ou MIF), qui est très résistant et infectieux. (5) La cellule hôte est lysée et les bactéries sont libérées dans l'environnement aquatique. (6) Les légionelles qui ne rencontrent pas de nouvelles cellules hôtes, s'établissent dans les biofilms. (7) Les légionelles planctoniques rencontrent une nouvelle cellule phagocytaire, un nouveau cycle commence. (8) Les légionelles cultivées en milieu liquide en présence de cellules phagocytaires, en phase exponentielle ou stationnaire, affichent de fortes similarités avec les formes répliquatives et transmissives respectivement.

Associée à la phase exponentielle de croissance, la phase de réplication est rencontrée quand les conditions sont favorables à la croissance. Dans le phagosome intra-amibien, les nutriments sont abondants et les légionelles adaptent leur expression génétique en faveur de la réplication (Molofsky et Swanson, 2004; Garduno, 2007). Les bactéries ne sont pas mobiles, leur paroi est rugueuse et elles contiennent peu de β -hydroxybutyrate, utilisable comme source de carbone et d'énergie (Rowbotham, 1986). Lorsque les nutriments de la vacuole deviennent limitant suite à leur consommation par les légionelles, les bactéries se différencient, passant de la phase répliquative à la phase transmissive. Les bactéries sont alors de petite taille, mobiles, présentent une paroi lisse et elles contiennent une quantité importante de β -hydroxybutyrate (Rowbotham, 1986). La diminution des ressources en acides aminés de la cellule hôte, entraîne l'augmentation de la quantité du facteur de la phase stationnaire *RpoS*, ce qui conduit à l'expression des gènes de la phase stationnaire (Hammer et Swanson, 1999). L'expression de ces gènes inhibe la multiplication cellulaire (Molofsky et Swanson, 2004; Garduno, 2007) et entraîne la synthèse d'inducteurs de la nécrose phagocytaire, de la mobilité, ainsi que des facteurs de résistance aux stress environnementaux (UV, chaleur, pression osmotique, nutriments limitant) (Byrne et Swanson, 1998; Alli *et al.*, 2000; Swanson et Hammer, 2000; Molofsky et Swanson, 2004; Garduno, 2007). Tous ces caractères sont absents lors de la phase répliquative. Lors de cette

phase transmissive, les légionelles préparent leur sortie de la cellule amibienne vers l'environnement aquatique, leur survie en phase planctonique et leur réintégration dans une nouvelle cellule hôte (Swanson et Hammer, 2000; Molofsky et Swanson, 2004; Garduno, 2007). Les bactéries intracellulaires, préparées à leur libération dans l'environnement aquatique expriment un phénotype appelé « Forme Intracellulaire Mature » (« Mature Intracellular Form » ou MIF). Les légionelles intracellulaires possèdent donc deux morphologies : la forme répliquative et la forme MIF. La forme répliquative correspond à une structure typique des bactéries à Gram négatif. Les bactéries MIF sont pléomorphes, avec une paroi épaisse. Elles sont très résistantes et contagieuses (Faulkner et Garduno, 2002; Garduno *et al.*, 2002; Greub et Raoult, 2003; Molofsky et Swanson, 2004; Garduno, 2007).

4.1.2. COLONISATION DES BIOFILMS

Dans les milieux aquatiques, le biofilm constitue pour les micro-organismes une matrice idéale pour leur multiplication et leur survie (Barbeau *et al.*, 1998; Atlas, 1999). Ce mode de vie est très répandu dans le monde microbien, il semble que la vie sessile présente des avantages vis-à-vis du mode de vie planctonique (Watnick et Kolter, 2000; Hindre *et al.*, 2008; Declerck, 2009). Dans les réseaux de distribution d'eau potable, le biofilm constitue le principal réservoir de micro-organismes. En effet, 95% de la flore microbienne est localisée dans le biofilm contre 5% seulement dans l'eau circulante (Flemming *et al.*, 2002; Codony *et al.*, 2005). Les biofilms peuvent se développer dans divers endroits tels que des tissus vivants, des dispositifs médicaux, des systèmes de distribution d'eau potable ou encore des systèmes aquatiques naturels (Donlan, 2002). Ils constituent des voies d'infection bactérienne privilégiées (Figure 1-14) (Costerton *et al.*, 1999; Matz *et al.*, 2011; Wingender et Flemming, 2011).

De nombreuses études montrent la présence des légionelles dans les biofilms, issus d'environnements naturels ou artificiels (Barbeau *et al.*, 1998; Atlas, 1999; Harb *et al.*, 2000; Fields *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006). Rogers et Keevil (1992) ont réalisé une étude portant sur la présence des légionelles dans un biofilm se développant dans un système de distribution d'eau. Ils ont montré qu'elles représentaient 2% de la flore cultivable du biofilm et que la concentration en légionelles sessiles est largement supérieure à celle des légionelles planctoniques (Rogers *et al.*, 1994). Ce résultat, confirmé par des études plus récentes menées par Flemming *et al.* (2002) ainsi que Wingender et Flemming (2011), tendent à supposer que le biofilm est un réservoir naturel des légionelles. Dans le biofilm, les légionelles sont capables de survivre dans des conditions environnementales très variées. Elles ont été détectées dans des prélèvements de rivières, de lacs où la température était comprise entre 3.0 et 22.5°C ; un pH entre 7.3 et 8.7 ; une conductivité entre 300 et 1050 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Grimm *et al.*, 1998). Le biofilm leur permet de se protéger contre des conditions environnementales défavorables (Storey *et al.*, 2004). Plus généralement, des études ont démontré l'effet protecteur du biofilm : les bactéries sessiles sont 50 à 1000 fois plus résistantes aux biocides que les bactéries planctoniques (Sutherland, 2001; McBain *et al.*, 2002; Fux *et al.*, 2005).

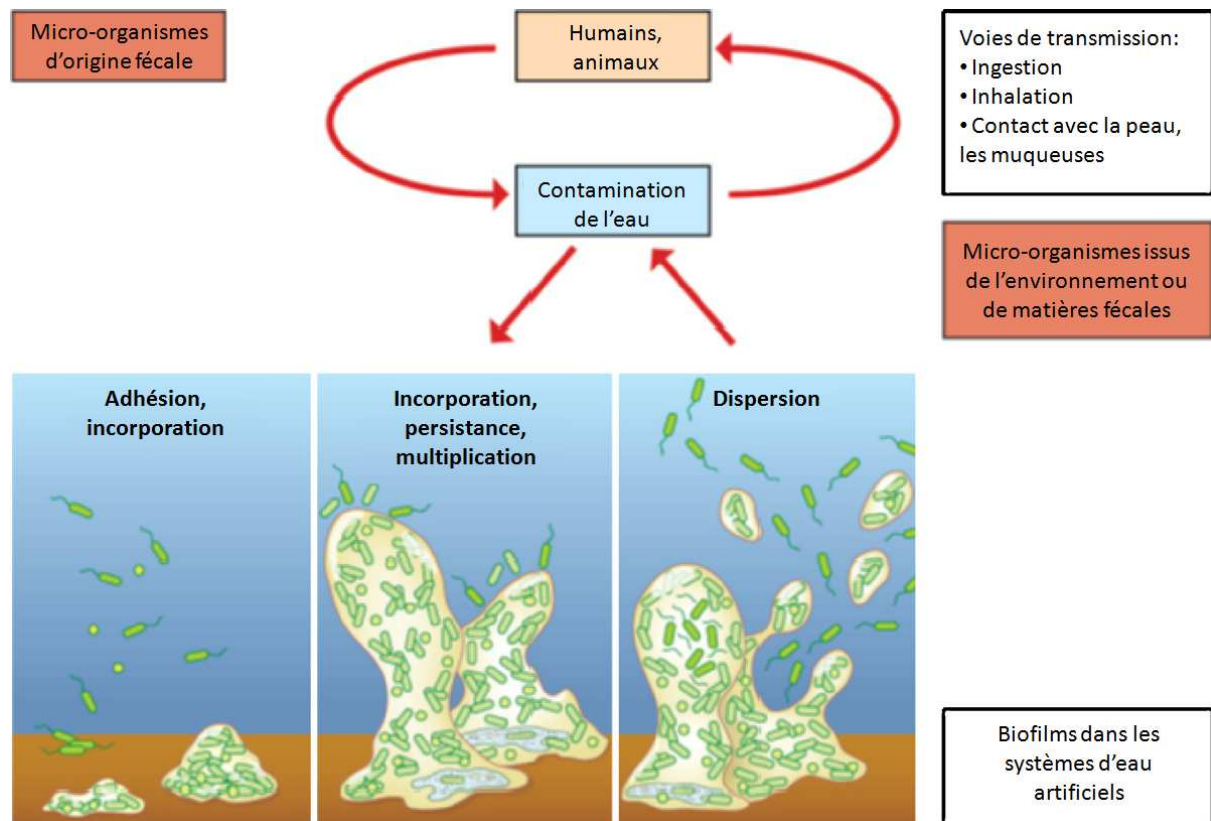


Figure 1-14: Rôle des biofilms en tant que réservoir de micro-organismes pathogènes et source de contamination de systèmes de distribution d'eau (d'après Wingender et Flemming, 2011).

Le biofilm est une structure complexe et hétérogène. Sa taille peut varier de quelques micromètres pour les biofilms constitués d'une seule couche cellulaire à plusieurs centaines de micromètres pour les biofilms denses (Wimpenny *et al.*, 2000; Langmark *et al.*, 2005). Il est constitué d'eau à 97%, de cellules microbiennes (bactéries, protozoaires, champignons, algues et autres organismes procaryotes ou eucaryotes), de polymères sécrétés par les micro-organismes eux même, de nutriments, de métabolites, de produits de dégradation cellulaire et de matériel particulaire provenant de l'environnement proche. Toutes les classes de macromolécules se retrouvent au sein du biofilm : protéines, polysaccharides, ADN, ARN, peptidoglycane, lipides, phospholipides... (Zhang *et al.*, 1998; Stoodley *et al.*, 1999; Sutherland, 2001; Wingender et Flemming, 2011). Le nombre de cellules contenues dans un biofilm est variable et il semble qu'environ 50% de ces cellules soient des cellules mortes (Tresse *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2003; Temmerman *et al.*, 2006). Dans un système de distribution d'eau potable, le nombre de cellule cultivable est généralement de 10^7 cellules/cm² (LeChevallier *et al.*, 1987; Pedersen, 1990; Langmark *et al.*, 2005).

La structure du biofilm se présente comme un agrégat de cellules microbiennes enchâssées dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS) où sont présents des canaux interstitiels permettant la diffusion des macromolécules (nutriments, enzymes, métabolites...) et la mobilité cellulaire (Allison et Sutherland, 1987; Schmitt et Flemming, 1999; Wingender et Flemming, 2011). La matrice d'EPS possède différentes fonctions primordiales au sein du biofilm. Elle permet le maintien de la structure du biofilm, le protège des agressions extérieures comme la déshydratation, les UV ou encore le broutage des prédateurs (Hughes *et al.*, 1998). Elle constitue un réservoir de nutriments et d'ions pour les bactéries et facilite les activités enzymatiques extracellulaires ainsi que la signalisation cellulaire. C'est le lieu de

transferts horizontaux de gènes entre bactéries et d'une communication intercellulaire dense, appelée « Quorum Sensing » (Rogers *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1998; Crespi, 2001; Sutherland, 2001; Velicer, 2003; Kreft, 2004; Aminov, 2011; Wingender et Flemming, 2011).

Le cycle d'évolution d'un biofilm se déroule en trois étapes (*Annexe VIII : Le biofilm*) : (1) l'attachement des micro-organismes, (2) la maturation du biofilm, (3) le détachement et la dispersion des cellules dans la phase circulante (Donlan, 2002; Declerck, 2009). Les organismes peuvent s'attacher aux surfaces immergées et former un biofilm mono ou pluri-espèces, ce sont les colonisateurs primaires. Ils peuvent également s'intégrer à un biofilm déjà formé, ils constituent alors les colonisateurs secondaires (Wingender et Flemming, 2011). Les légionelles sont capables de s'intégrer ou de former un biofilm (Murga *et al.*, 2001; Storey *et al.*, 2004; Declerck *et al.*, 2007b). Piao *et al.* (2006) ont montré, sur un pilote et en conditions nutritives riches, que *L. pneumophila* est capable de former un biofilm mono-espèce dont la structure et la stabilité dépendent de la température. Dans des conditions naturelles, c'est-à-dire généralement pauvres en nutriment, les légionelles sont des colonisateurs secondaires des biofilms (Watnick et Kolter, 2000; Mampel *et al.*, 2006; Piao *et al.*, 2006; Declerck, 2009). Plusieurs études ont montré que les légionelles sont capables de coloniser rapidement (<2h) des biofilms pluri-espèces (Murga *et al.*, 2001; Vervaeren *et al.*, 2006; Declerck, 2009; Declerck *et al.*, 2009). Les mécanismes cellulaires par lesquels les légionelles adhèrent à un biofilm déjà formé sont méconnus. Ces mécanismes peuvent être de deux types, le contact physique avec les autres micro-organismes présents ou le Quorum Sensing (Declerck, 2009). Mampel *et al.* (2006) ont montré, en réacteur, que les légionelles sont capables d'intégrer un biofilm mono-espèce constitué d'*Empedobacter breve*, *Microbacterium* sp. ou *Acinetobacter baumannii* alors qu'elles sont incapables d'adhérer à un biofilm formé par les espèces *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium glutamicum* ou *Klebsiella pneumoniae*. Les auteurs concluent de ces expériences que certaines bactéries ont la faculté de s'opposer par compétition à l'adhérence des légionelles dans un biofilm.

Le rôle des protozoaires dans la survie des légionelles dans les biofilms n'est pas clair. Les protozoaires sont des régulateurs important des populations bactériennes dans les biofilms (Hilbi *et al.*, 2007). La présence des légionelles dans les biofilms est généralement associée avec celle des amibes (Henke et Seidel, 1986; Fields *et al.*, 1990b; Thomas *et al.*, 1999). D'après ces études menées en laboratoire, il semble que les légionelles puissent survivre en absence des amibes mais que leur multiplication est dépendante de leur présence (Murga *et al.*, 2001; Kuiper *et al.*, 2004; Declerck *et al.*, 2007b). La multiplication extracellulaire des légionelles dans les biofilms est une question qui reste en suspens et les études portées sur cette problématique peuvent aboutir à des résultats différents (Rogers *et al.*, 1994; Storey *et al.*, 2004). Des études menées sur des biofilms représentatifs de biofilms naturels tendent à supposer que les protozoaires ne sont pas nécessaires à la multiplication des légionelles en phase sessile (Tison *et al.*, 1980; Wright *et al.*, 1989; Rogers et Keevil, 1992; Surman *et al.*, 2002; van der Kooij *et al.*, 2005). La proximité d'autres micro-organismes qui sécrètent des composés extracellulaires, sources de carbone et d'énergie, permettrait aux légionelles de se multiplier extracellulairement dans le biofilm (Tison *et al.*, 1980; Bohach et Snyder, 1983a; Wadowsky et Yee, 1985). D'autres études suggèrent que les ressources nécessaires à la croissance extracellulaire des légionelles dans les biofilms, et notamment les acides aminés, proviennent de la dégradation de matières organiques (Stout *et al.*, 1985; Devos *et al.*, 2005). Ces résultats ont été confirmés récemment par Temmerman *et al.* (2006) qui ont

montré que les légionelles pouvaient puiser leur ressource nutritive via les débris organiques des cellules mortes présentes dans le biofilm. Plusieurs auteurs concluent (Temmerman *et al.*, 2006; Declerck *et al.*, 2009), suite à ces études, que le mécanisme principal de croissance des légionelles dans les biofilms est la multiplication intra-amibienne mais que la voie nécrotrophe n'est pas négligeable.

Les bactéries intégrant un biofilm présentent un phénotype particulier induit par leur mode de vie sessile (Donlan et Costerton, 2002; Hindre *et al.*, 2008). Hindre *et al.* (2008) ont mené une étude de comparaison de l'expression génétique entre des légionelles en phase sessile et planctonique. Sur les 2932 gènes analysés, 2.3% (soit 69 gènes) sont exprimés différemment en phase sessile. Ils ont montré que les bactéries en phase sessile ont un phénotype proche des bactéries en phase répliative. Molofsky et Swanson (2003) ont identifié l'expression, lors de la phase sessile, d'un gène codant pour un régulateur global, le CsrA. Ce régulateur réprime les traits de la phase transmissive et de survie, confirmant le caractère favorable du biofilm pour les légionelles. Cependant, alors que la protéine CsrA est un répresseur du gène codant pour les flagelles (exprimé en phase transmissive) (Fettes *et al.*, 2001; Brüggemann *et al.*, 2006), ce gène est également exprimé en phase sessile. Le phénotype biofilm, proche du phénotype observé en phase répliative, est caractérisé par l'expression de gènes spécifiques à la fois de la phase transmissive (gène codant pour le flagelle) et de la phase répliative (gène codant pour la protéine CsrA). Il semble donc qu'en phase sessile, les systèmes de régulation soient modifiés (Hindre *et al.*, 2008). Ces résultats sont en accord avec ceux déduits d'études menées sur *Escherichia coli* (Domka *et al.*, 2007) où les gènes codant pour les flagelles sont exprimés en phase sessile quelque soit le statut physiologique des bactéries. Le phénotype biofilm entraîne également une baisse de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens (Shirtliff *et al.*, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Plusieurs gènes, tel que l'*ahpC2D*, responsable de la production d'alkylhydroperoxyde réductase, sont surexprimés chez les légionelles sessiles. Ces gènes sont impliqués dans la lutte contre le stress oxydant (Rocha et Smith, 1999; LeBlanc *et al.*, 2006; Hindre *et al.*, 2008).

Toutes ces études ont permis à Lau et Ashbolt (2009) d'établir un modèle de propagation et de distribution des légionelles dans un réseau de distribution d'eau potable. Ce modèle décrit le rôle du biofilm ainsi que des amibes dans la prolifération et la dissémination des légionelles dans les réseaux (Figure 1-15).

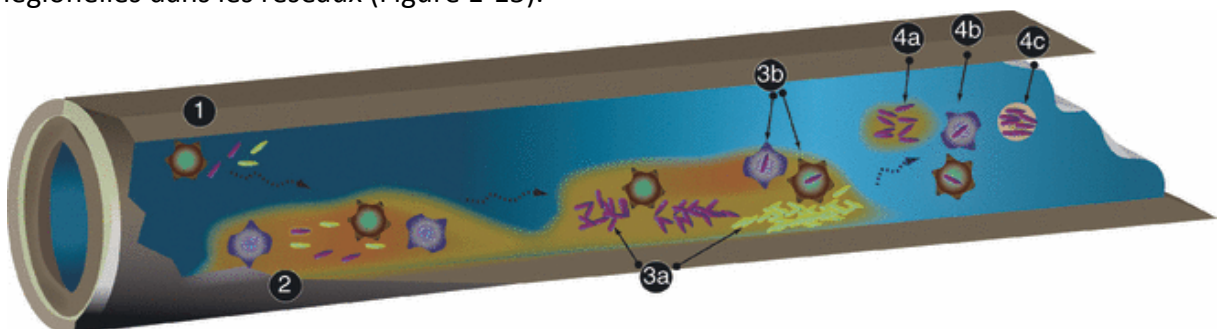


Figure 1-15: Modèle de propagation des légionelles dans un système de distribution d'eau potable (d'après Lau et Ashbolt, 2009).

Les légionelles et les différentes espèces de protozoaires entrent dans le système d'eau potable (1) et intègrent des biofilms (2). Elles se multiplient de façon extracellulaire dans le biofilm (3a) ou sont internalisées par les protozoaires (3b). Les légionelles peuvent être transférées vers la voie circulante selon différents mécanismes, (i) une partie du biofilm où elles ont proliféré peut se détacher (4a), (ii) elles peuvent évoluer dans la phase circulante de manière intracellulaire dans les protozoaires (sous formes trophozoïtes ou kystes) (4b), (iii) ou elles peuvent circuler dans une vésicule issue de la réplication intra-protozoaire (4c).

4.2. HABITATS AQUATIQUES

4.2.1. PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT NATUREL

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement aquatique. Pourtant, les études portant sur leur présence dans les environnements naturels sont peu nombreuses comparées à celle s'attardant sur les environnements artificiels qui constituent la source principale des légionelles incriminées dans des cas de légionellose. L'ensemble des études réalisées sur l'occurrence des légionelles dans les milieux aquatiques naturels ont révélé leur caractère ubiquitaire ainsi que leur capacité à se développer et à survivre dans des environnements très variés. Parmi celles détectées dans ces environnements, les espèces les plus abondantes semblent être *L. anisa* (Van Der Mee-Marquet *et al.*, 2006) et *L. pneumophila* (Ortiz-Roque et Hazen, 1987; Verissimo *et al.*, 1991).

Fliermans *et al.* (1979) isolent pour la première fois, dans des échantillons d'eau de lac, des *L. pneumophila* et montrent par cette étude que les légionelles constituent, avec des concentrations allant de 10^4 à 10^6 cellules/L, une part importante de la communauté microbienne des lacs étudiés. Depuis, des légionelles ont été détectées dans de très nombreux habitats aquatiques tels que les rivières, les lacs ou encore les eaux souterraines (Verissimo *et al.*, 1991 ; Riffard *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Parthuisot *et al.*, 2010). Avec 100% de détection sur 793 échantillons environnementaux analysés, Fliermans *et al.* (1981) montrent qu'elles sont capables de se développer et de survivre dans des environnements très variés. Des études plus récentes révèlent que les légionelles constituent également des membres significatifs de communautés microbiennes se développant dans des environnements extrêmes. En effet, ces bactéries sont capables de résister à de très larges gammes de pH et de température. Sheehan *et al.* (2005) ont montré la présence de légionelles dans des eaux très chaudes (de 25 à 60°C) et à pH très acide (pH 2.7). Inversement, les légionelles sont capables de survivre dans des milieux très froids (Carvalho *et al.*, 2008). Ortiz-Roque et Hazen (1987) démontrent pour la première fois, leur capacité à survivre dans les eaux salées de Puerto Rico. Ce résultat a été confirmé plus récemment par Palmer *et al.* (1993) et par Bennett et Bentham (2006) qui montrent que la présence de légionelles dans les eaux salées provient de la rivière qui contaminée en légionelles les déversent dans l'océan. Différentes études ont également été menées sur des prélèvements de sol et de sédiment. Bien que ces études soient peu nombreuses, elles ont démontré la présence des légionelles et notamment de l'espèce *L. pneumophila* dans ces milieux (Wallis et Robinson, 2005). *L. longbeachae* est fréquemment isolée à partir de composts de plantes. La manipulation de compost contaminé par la bactérie serait responsable de 50% des cas de légionellose en Australie (Steele *et al.*, 1990; Den Boer *et al.*, 2007; O'Connor *et al.*, 2007).

4.2.2. PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT ARTIFICIEL

Les légionelles trouvent dans les milieux artificiels des conditions favorables à leur survie et à leur développement. Des concentrations non négligeables ont été retrouvées dans diverses installations telles que les réseaux d'eaux chaudes sanitaires, les systèmes de distribution d'eau potable, les jacuzzis ou encore les TAR (Stout *et al.*, 1985 ; Alary et Joly, 1991; Luck *et al.*, 1993; Dutil *et al.*, 2006). Ces études montrent qu'une partie de ces systèmes sont colonisés par des légionelles et d'autres micro-organismes. Borella *et al.* (2004) réalisent une

étude, en Italie, sur plus de 140 prélèvements d'eaux chaudes domestiques où 22.6% des prélèvements contenaient des légionelles dont 75.8% l'espèce *L. pneumophila* avec des concentrations en *Legionella* totales de l'ordre de 10^3 UFC/L. De même, dans un hôtel, des concentrations supérieures à 4500 UFC/L ont été détectées avec un pourcentage de prélèvements positifs approchant les 50% (Garcia-Nunez *et al.*, 2006). Ragull *et al.* (2007) détectent des concentrations en *L. pneumophila* supérieures à 10^5 UFC/L dans différentes TAR.

L'identification des souches de légionelles détectées dans les installations artificielles permet de souligner le fait que celles-ci semblent spécifiques de leur origine géographique voire de l'installation étudiée (Sabria *et al.*, 2001; Amemura-Maekawa *et al.*, 2005; Garcia-Nunez *et al.*, 2006; Ragull *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2008). Ces auteurs montrent également la grande persistance temporelle des clones détectés dans les installations (Garcia-Nunez *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2008). Cependant, toutes les souches de légionelles ne semblent pas présenter la même distribution. Les souches responsables de plus de 15% des cas de légionelloses annuels en France, la souche Paris et la souche Lorraine, ont été décrites comme présentant une distribution environnementale européenne et probablement mondiale avec une occurrence dans les réseaux de distribution d'eau dans de nombreuses régions françaises (Aurell *et al.*, 2003; Amemura-Maekawa *et al.*, 2005). Les études démontrant la stabilité temporelle des clones de légionelles sont basées sur l'analyse génétique des sous-types colonisant les milieux artificiels. Lors de ces études, les auteurs mettent en évidence une distribution différente des sous-types de légionelles cliniques ou environnementales. Sur plus de 600 souches de légionelles isolées de patients ou de l'environnement, les souches environnementales sont à 28.2% des *L. pneumophila* séro groupe 1 et *L. anisa* à 13.8% alors que les souches cliniques sont en majorité des *L. pneumophila* séro groupe 1 (95.4%). *L. anisa* ne représente que 0.8% des souches isolées de patients (Doleans *et al.*, 2004 ; Den Boer *et al.*, 2008). Ces résultats déterminés sur la base du sérogroupage sont confirmés dans plusieurs études portant sur l'analyse génétique des sous-types de légionelles (Sabria *et al.*, 2001; Amemura-Maekawa *et al.*, 2005; Coscolla et Gonzalez-Candelas, 2009; Gomez-Valero *et al.*, 2009).

Selon Barry S. Fields (1996): « *Legionnaires' disease is usually a consequence of altering the environment for human benefit.* ». L'altération thermique provoquée par l'échauffement de l'eau naturelle permet aux légionelles de se multiplier dans les réseaux, puis d'être diffusées sous forme d'aérosols dans l'atmosphère. La majorité des cas de légionelloses est associée à des environnements artificiels où la température observée dans ces installations est supérieure à la température ambiante (Fields *et al.*, 2002). Les TAR et les réseaux de distribution d'eau, de part leur structure et leur mode de fonctionnement (échauffement de l'eau, présence de bras mort et de boucles, corrosion et tartre, nature des matériaux...), présentent des caractéristiques particulièrement favorables à la prolifération et à la dissémination des légionelles (Stout *et al.*, 1985; Levi, 2001; Fields *et al.*, 2002; Ohno *et al.*, 2003).

Compte-tenu de la diversité des situations dans lesquelles les légionelles se développent, tant du point de vue des caractéristiques de l'eau que de celles de la structure des réseaux, il semble exister une écologie complexe des légionelles comme résumé sur la Figure 1-16 (Levi, 2001).

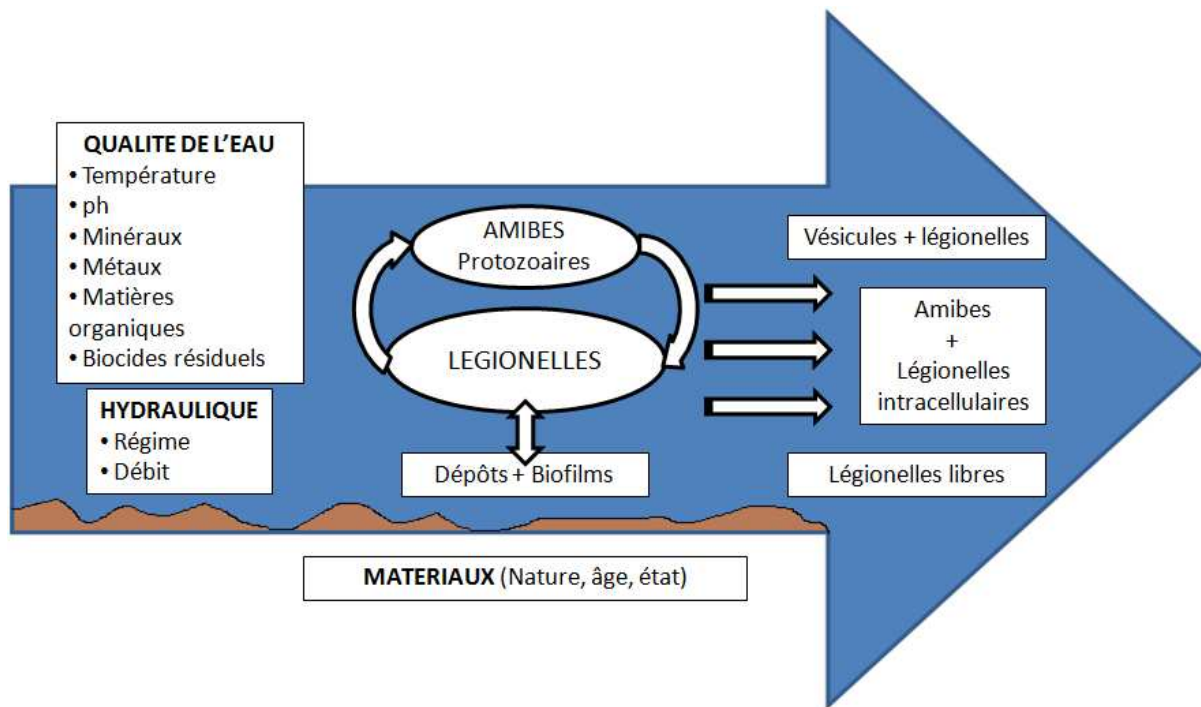


Figure 1-16: Représentation schématique des diverses composantes de l'écologie des légionelles dans les systèmes de distribution d'eaux (d'après Levi, 2001).

4.3. INTERACTIONS ABIOTIQUES ET BIOTIQUES DES LEGIONELLES AVEC LEUR ENVIRONNEMENT

4.3.1. FACTEURS DE REGULATION ABIOTIQUES DES COMMUNAUTES DE LEGIONELLES

Le premier élément clé influençant le développement des légionelles est la température du milieu dans lequel elles résident. Les légionelles sont capables de survivre entre 5 et 63°C mais elles ne se multiplient que sur une gamme de température plus étroite : entre 25 et 42°C (Dennis *et al.*, 1984; Wadowsky *et al.*, 1985; Paszko-Kolva *et al.*, 1993b; Fliermans, 1996; Heller *et al.*, 1998). Le pH est également un paramètre influençant la croissance des légionelles. Une corrélation positive entre la concentration en *Legionella* totale et le pH a été démontrée lors de plusieurs études (Kusnetsov *et al.*, 2003; Leoni *et al.*, 2005). Bien qu'elles aient été détectées dans des environnements très acides (Sheehan *et al.*, 2005), les légionelles sont capables de se multiplier sur une gamme de pH allant de 5.5 à 8.5 (Wadowsky *et al.*, 1985; Ohno *et al.*, 2003). D'après Wadowsky *et al.* (1985), le pH optimal pour leur multiplication *in vitro* est de 6.9.

D'autres éléments chimiques ont également la faculté de favoriser ou d'inhiber la croissance des légionelles dans leur environnement. Des études en laboratoire ont montré que le fer, notamment, est un élément essentiel pour leur croissance extra et intracellulaire (James *et al.*, 1995; Hickey et Cianciotto, 1997; Bargellini *et al.*, 2011). Les légionelles possèdent plusieurs mécanismes d'acquisition du fer (Starkenbourg *et al.*, 2004) et sont capables d'assimiler cet élément sous ses différentes formes chimiques (nitrate de fer (III), sulfate de fer (II), chlorure de fer, phosphate de fer...) (Reeves *et al.*, 1981; O'Connell *et al.*, 1996). La

nature des matériaux peut constituer des sources d'éléments propices au développement de la bactérie. Ainsi, dans des réseaux d'eau, les phénomènes de corrosion peuvent entraîner la libération d'une quantité importante de fer, ce qui tend à renforcer le développement des légionelles dans ce type d'installation (States *et al.*, 1985). Le cuivre, le calcium, le magnésium, le zinc, le manganèse sont des éléments qui en fonction de leur concentration, *in vitro* ou *in vivo*, sont capables de favoriser l'activité des légionelles ou de l'inhiber en induisant un stress cellulaire (Reeves *et al.*, 1981; States *et al.*, 1985; Lee et West, 1991; Blanc *et al.*, 2005; van der Kooij *et al.*, 2005). Borella *et al.* (2004) montrent que dans un réseau d'eau chaude, aucune légionelle n'est détectée si la concentration en zinc est inférieure à 100 µg/L, la concentration en fer est inférieure à 20 µg/L et le cuivre supérieur à 50 µg/L.

L. pneumophila a également des exigences nutritives particulières. En effet, étant incapable de synthétiser différents acides aminés (arginine, cystéine, méthionine, sérine, thréonine et valine), cette ressource est un facteur limitant à son développement (Tesh et Miller, 1981). La synthèse des acides aminés est souche-dépendante. Certaines souches de *L. pneumophila* nécessitent, en plus des acides aminés cités précédemment, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine et la tyrosine (George *et al.*, 1980). Des études en laboratoire (Byrne et Swanson, 1998; Hammer et Swanson, 1999; Heuner *et al.*, 1999) ont montré que la croissance intracellulaire des légionelles dépend de la disponibilité des acides aminés dans leur cellule hôte. Lorsque la quantité d'acides aminés devient limitante, les légionelles passent de la phase répliquative à la phase transmissive, où la multiplication cellulaire est réprimée pour favoriser la survie des bactéries. Inversement, le retour à des conditions intracellulaires riches en acides aminés stimule l'entrée dans la phase répliquative.

Ces éléments physico-chimiques ayant une influence probable sur la prolifération des légionelles ont été exploités afin d'être utilisés comme facteurs prédictifs de leur multiplication (States *et al.*, 1985; Stout *et al.*, 1985; Wadowsky *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1992; Rogers *et al.*, 1994; Zanetti *et al.*, 2000; Ohno *et al.*, 2003; Riffard *et al.*, 2003; Lasheras *et al.*, 2006). Bien que différents facteurs aient été identifiés comme favorables ou non à la présence des légionelles (voir précédemment), les études réalisées par des mesures *in vivo* de plusieurs paramètres physico-chimiques et des concentrations en légionelles (totales ou viables) n'ont pas permis d'identifier des facteurs physico-chimiques prédictifs des événements de prolifération des légionelles dans les environnements artificiels. Les légionelles ont la capacité de se développer dans différents habitats sans sembler marquer de préférence pour des conditions physico-chimiques particulières. L'ensemble de ces résultats soulignent la nécessité de combiner plusieurs facteurs abiotiques et biotiques pour identifier des indicateurs de la présence des légionelles.

4.3.2. INTERACTIONS BIOTIQUES DES LÉGIONELLES AVEC D'AUTRES MICRO-ORGANISMES

Les mécanismes de régulation des populations de légionelles par des phénomènes biotiques sont des facteurs clés pour la compréhension de leur écologie et pour l'estimation des risques sanitaires liés à la présence de ce pathogène dans les milieux aquatiques naturels ou artificiels. Depuis les années 1980, des études en laboratoire ont permis d'identifier différents micro-organismes interagissant avec les légionelles. Plus récemment, des études réalisées en conditions réelles ont permis de confirmer ces résultats.

4.3.2.1. INTERACTIONS CONNUES AVEC D'AUTRES ESPECES BACTERIENNES

La présence simultanée de certains micro-organismes avec les légionelles peut agir en faveur ou au contraire en défaveur de la présence des légionelles dans les milieux.

Toze *et al.* (1990) ont recherché dans un réseau d'eau potable, les bactéries naturellement présentes ayant une activité inhibitrice sur les légionelles. Ils ont montré, par co-culture sur milieu BCYE, que 15 à 30% des bactéries isolées de ce milieu présentent une activité antibactérienne contre le genre *Legionella*. Parmi ces micro-organismes, les bactéries du genre *Aeromonas*, ainsi que *Brevundimonas vesicularis* inhibent l'ensemble des espèces de légionelles, et *Vibrio fluvialis* possède une activité inhibitrice sur l'ensemble des légionelles à l'exception de l'espèce *L. pneumophila*. Les mécanismes par lesquels ces micro-organismes agissent sur les populations de légionelles n'ont pas été identifiés. Il semble que leur capacité inhibitrice soit dépendante de la présence de L-cystéine dans leur milieu de culture. Ce résultat a plus récemment été confirmé par une étude de Kimiran Erdem et Yazici (2008).

Les capacités d'inhibition / potentialisation des micro-organismes sont des phénomènes espèce- voir souche-spécifiques. Suite à leur étude réalisée en 1990, Toze *et al.* (1994) ont montré la forte spécificité anti-légionelles des bactéries du genre *Aeromonas*, des micro-organismes ubiquitaires des environnements aquatiques et terrestres. Ces bactéries ne possèdent pas d'activité inhibitrice sur les genres autres que *Legionella* testés (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae*). Cependant, sur l'ensemble des espèces appartenant au genre *Legionella* testées (*L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae*, *L. micdadei*, *L. oakridgensis*, *L. wadsworthii*, *L. anisa*, *L. erythra*), il semble que les bactéries du genre *Aeromonas* ne possèdent pas d'activité sur les espèces *L. pneumophila* et *L. longbeachae*.

Brevundimonas vesicularis, (suite à un changement de nomenclature en 1994, *Pseudomonas vesicularis* devient *Brevundimonas vesicularis* (Segers *et al.*, 1994)) en fonction de l'espèce de légionelles, peut avoir un caractère potentialisateur ou inhibiteur (Koide *et al.*, 1989; Toze *et al.*, 1990). Peu d'études sur les interactions entre *Brevundimonas vesicularis* et les légionelles ont été réalisées par la suite.

Plusieurs études montrent l'effet inhibiteur des bactéries du genre *Pseudomonas* sur les légionelles (Gomez-Lus *et al.*, 1993; Paszko-kolva *et al.*, 1993a; Padilla *et al.*, 1996; Vachée *et al.*, 1997). Ces interactions peuvent être intracellulaires. Une compétition avec *L. pneumophila* peut être observée lorsque les deux espèces se retrouvent dans une même vacuole intra-amibienne, il y a alors compétition pour les ressources nutritives fournies par l'amibe (Declerck *et al.*, 2005; Guerrieri *et al.*, 2008). Ce genre de compétition est également retrouvé entre *L. pneumophila* et les espèces *Burkholderia cepacia* et *Burkholderia*

pseudomallei, parasites des amibes (Borella *et al.*, 2005). Les interactions entre les genres *Legionella* et *Pseudomonas* peuvent également être extracellulaires. Une étude de Guerrieri *et al.* (2007) montre, en laboratoire, que les *Pseudomonas* sp. peuvent favoriser ou inhiber la survie des légionelles selon la température du milieu : à 30°C, un phénomène d'inhibition de la survie est observé alors qu'à 4°C, la survie de *L. pneumophila* est favorisée par la présence de *Pseudomonas* sp. Les *Pseudomonas* sp. secrètent des substances apparentées aux bactériocines (« Bacteriocin-Like Substance » ou BLS) anti- *L. pneumophila*. Ils ont également la capacité, par un mécanisme encore inconnu, d'inhiber l'attachement ou de favoriser le détachement des légionelles à un biofilm artificiel (Guerrieri *et al.*, 2007; Guerrieri *et al.*, 2008).

Hécharde *et al.* (2005) ont caractérisé une bactériocine isolée d'une souche de *Staphylococcus warneri*, appelée « warnericin RK », spécifiquement dirigée contre le genre *Legionella*. Depuis d'autres peptides synthétisés par le même micro-organisme ont été identifiés (Verdon *et al.*, 2008). D'après les travaux de Verdon *et al.* (2008) et de Marchand *et al.* (2011), ces peptides semblent agir en perturbant la membrane cellulaire par la formation de pores.

Des effets synergiques entre les légionelles et d'autres micro-organismes ont été également découverts. Les cyanobactéries, telle que *Fischerella* sp., les algues vertes, *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Gleocystis* sp., ont une activité favorisant le développement des légionelles (Tison *et al.*, 1980; Berendt, 1981; Pope *et al.*, 1982; Bohach et Snyder, 1983b). Les légionelles produisent du CO₂ qui va être consommé par les micro-organismes photosynthétiques. En retour, ces micro-organismes produisent la matière organique et des métabolites nécessaires au développement des légionelles. Par exemple, les cyanobactéries, telles que *Fischerella* sp., sécrètent un métabolite stimulant le captage de l'oxygène par les légionelles et favorisent ainsi leur multiplication. Ce phénomène est important en écologie car les cyanobactéries sont capables de se développer en quantité importante (bloom) dans les bassins d'eau stagnante, libérant ainsi de nombreux métabolites potentiellement utilisables par les légionelles. De même, certaines bactéries, comme *Flavobacterium breve*, synthétisent de la L-cystéine, élément essentiel au développement des légionelles, ces organismes sont des potentialisateurs des légionelles (Wadowsky et Yee, 1983; Muller *et al.*, 1996). Bien que ces études aient été réalisées en laboratoires, la co-occurrence de ces organismes avec les légionelles dans des milieux aquatiques tend à supposer que ce phénomène est naturel (Wadowsky et Yee, 1983, 1985).

A l'inverse, les légionelles peuvent être parasitées par d'autres micro-organismes. Ce parasitisme conduit à leur lyse. Un seul micro-organisme parasite des légionelles est, à ce jour, connu. Il s'agit de l'espèce *Bdellovibrio bacteriovorus* (Tomov *et al.*, 1982; Richardson, 1990). Ce micro-organisme est un parasite des bactéries à Gram négatif (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*...) qui se développe sous la paroi bactérienne et inhibe la réplication de l'ADN et la synthèse protéique (Sackett, 2009).

Une liste non exhaustive des différentes interactions connues entre les espèces *Legionella* et d'autres micro-organismes bactériens est présentée dans le tableau suivant (Table 1-2).

Table 1-2: Interactions (positives ou négatives) connues des légionelles avec d'autres espèces procaryotes (déterminées par des méthodes culturelles).

Organismes		Espèce de <i>Legionella</i> testée	Références
Cyanobacteria			
<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	+	<i>L. pneumophila</i>	Pope <i>et al.</i> , 1982
<i>Fisherella</i> sp.	+	<i>L. pneumophila</i>	Tison <i>et al.</i> , 1980; Berendt, 1981; Pope <i>et al.</i> , 1982; Bohach et Snyder, 1983b, 1983a
<i>Nostoc</i> sp.	+	<i>L. pneumophila</i>	Pope <i>et al.</i> , 1982
<i>Oscillatoria</i> sp.	+	<i>L. pneumophila</i>	Tison <i>et al.</i> , 1980
<i>Phormidium</i> sp.	+	<i>L. pneumophila</i>	Tison <i>et al.</i> , 1980; Pope <i>et al.</i> , 1982
<i>Synechocystis</i> sp.	+	<i>L. pneumophila</i>	Pope <i>et al.</i> , 1982
α-proteobacteria			
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	+ / -	<i>L. bozemanæ</i> <i>L. micdadei</i> <i>L. dumoffii</i> <i>L. oakridgensis</i> <i>L. gormanii</i> <i>L. pneumophila</i> <i>L. longbeachæ</i> <i>L. wadsworthii</i>	Koide <i>et al.</i> , 1989; Toze <i>et al.</i> , 1990; Arata <i>et al.</i> , 1994
β-proteobacteria			
<i>Alcaligenes</i> sp.	+	<i>L. pneumophila</i>	Lee et West, 1991
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	<i>L. pneumophila</i>	Guerrieri <i>et al.</i> , 2008
γ-proteobacteria			
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+	<i>L. pneumophila</i>	Gueriri <i>et al.</i> , 2008 ; Guerrieri <i>et al.</i> , 2008
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>L. pneumophila</i> <i>L. wadsworthii</i> <i>L. oakridgensis</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>L. pneumophila</i> <i>L. wadsworthii</i> <i>L. oakridgensis</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993; Guerrieri <i>et al.</i> , 2008
<i>Aeromonas sobria</i>	-	<i>L. pneumophila</i> <i>L. wadsworthii</i> <i>L. oakridgensis</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Citrobacter</i> sp.	-	<i>L. pneumophila</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Enterobacter</i> sp.	-	<i>L. pneumophila</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Escherichia</i> sp.	-	<i>L. pneumophila</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>L. pneumophila</i> <i>L. wadsworthii</i> <i>L. oakridgensis</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Proteus</i> sp.	-	<i>L. pneumophila</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+ / -	<i>L. dumoffii</i> <i>L. oakridgensis</i> <i>L. gormanii</i> <i>L. pneumophila</i> <i>L. longbeachæ</i> <i>L. wadsworthii</i>	Rowbotham, 1986; Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993; Fliermans, 1996; Leoni et Legnani, 2001; Guerrieri <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	<i>L. pneumophila</i>	Guerrieri <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas putida</i>	-	<i>L. pneumophila</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Salmonella</i> sp.	-	<i>L. pneumophila</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Serratia</i> sp.	-	<i>L. pneumophila</i>	Gomez-Lus <i>et al.</i> , 1993
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	<i>L. pneumophila</i>	Guerrieri <i>et al.</i> , 2008
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	<i>L. bozemanæ</i> <i>L. micdadei</i> <i>L. dumoffii</i> <i>L. oakridgensis</i> <i>L. gormanii</i> <i>L. wadsworthii</i> <i>L. longbeachæ</i>	Toze <i>et al.</i> , 1990
δ-proteobacteria			
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	-	<i>L. bozemanæ</i> <i>L. pneumophila</i> <i>L. micdadei</i>	Tomov <i>et al.</i> , 1982
Firmicutes			
<i>Bacillus</i> sp.	-	<i>L. pneumophila</i>	Carrington, 1979
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>L. pneumophila</i>	Carrington, 1979
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	<i>L. pneumophila</i>	Flesher <i>et al.</i> , 1980
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>L. pneumophila</i>	Carrington, 1979
<i>Streptococcus</i> sp.	-	<i>L. pneumophila</i>	Flesher <i>et al.</i> , 1980
Bacteroidetes			
<i>Flavobacterium breve</i>	+	<i>L. pneumophila</i>	Wadowsky et Yee, 1983; Muller <i>et al.</i> , 1996

Par ailleurs, bien que les bactériophages soient connus pour jouer un rôle important dans la régulation des populations bactériennes, leur rôle dans le contrôle des populations de légionelles est aujourd'hui encore méconnu. Quatre phages isolés à partir d'eaux douces, appartenant à la famille des *Myoviridae*, peuvent infecter exclusivement le genre *Legionella* (Figure 1-17) (Lammertyn *et al.*, 2008).

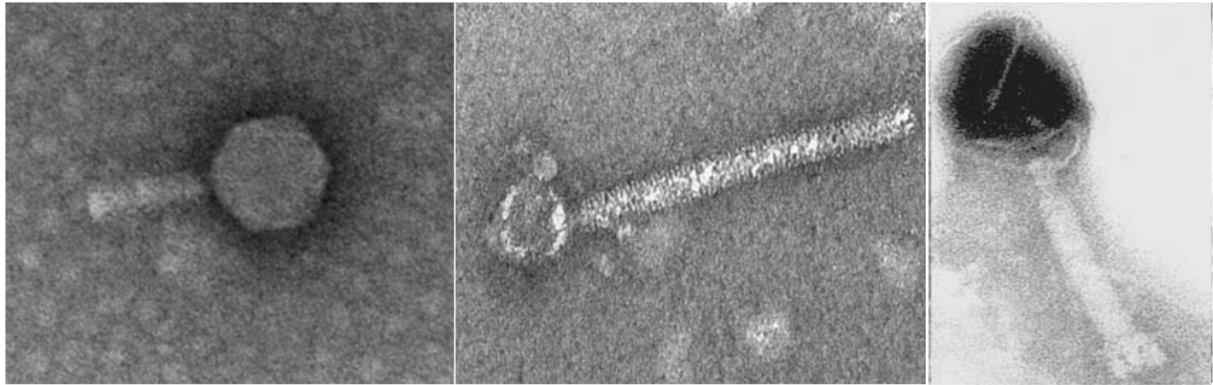


Figure 1-17: Phages de *Legionella* observés en microscopie électronique à transmission, grossissement x 110000 (d'après Lammertyn *et al.*, 2008).

4.3.2.2. INTERACTIONS AVEC LES PROTOZOAIRES

Les interactions des légionelles avec les protozoaires sont de deux formes (Atlas, 1999):

- la **prédation** : les protozoaires utilisent les bactéries comme source de nutriment par broutage ;
- le **parasitisme** : les légionelles infectent les protozoaires pour se multiplier.

Les protozoaires sont reconnus pour être des amplificateurs naturels des légionelles (Riffard *et al.*, 2003). Les légionelles sont capables de coloniser différents types de protozoaires : trois espèces de ciliés et une vingtaine d'espèces d'amibes sont connues pour être des hôtes de ces bactéries (Table 1-3).

De nombreuses études ont montré la coexistence des protozoaires et des légionelles, que ce soit dans les milieux naturels ou artificiels (Rowbotham, 1980; Smith-Somerville *et al.*, 1991; Fields, 1993; Berk *et al.*, 1998). Wadowsky *et al.* (1991) en analysant de l'eau du robinet, ont démontré la croissance des légionelles internalisées dans une amibe, *Hartmannella vermiformis*. Ces deux organismes sont également présents dans un système de distribution d'eau d'un hôpital où une corrélation positive entre la présence concomitante des légionelles (*L. anisa*, *L. bozeman*, *L. gormanii*, *L. micdadei*, *L. pneumophila*, *L. rubilicens*, *L. sainthelensis*, *L. steigerwaltii*) et des amibes (*Acanthamoebae polyphaga*, *Acanthamoebae hatchetti*, *Hartmannella vermiformis*, *Rosculus* sp., *Vahlkampfia* sp. *Hartmannella vermiformis*) a été observée (Sanden *et al.*, 1992). Les interactions entre les légionelles et les amibes sont des interactions espèce- voir souche-spécifiques (Fields *et al.*, 1990a; Neumeister *et al.*, 1997) comme montré par Fields *et al.* (1990b) concernant la relation entre *L. anisa* et *Hartmannella vermiformis*. Neumeister *et al.* (1997) montrent par des essais de co-culture que l'amibe *Acanthamoebae castellanii* supporte la multiplication *in vitro* de l'espèce *L. dumoffii* alors que les espèces *L. oakridgens*, *L. micdadei*, *L. bozeman*, *L. pneumophila* sérotype 6 ATCC 33215, *L. gormanii*, *L. steigerwaltii*, *L. longbeachae* sérotype 1, *L. jordanis* et *L. anisa* ne se multiplient pas dans cette amibe.

Table 1-3: Interactions connues des légionelles avec des espèces eucaryotes.

Organismes		Références
Algues vertes (association)	<i>Chlorella</i> sp.	Pope <i>et al.</i> , 1982
	<i>Gleocystis</i> sp.	Pope <i>et al.</i> , 1982
	<i>Scenedesmus</i> sp.	Pope <i>et al.</i> , 1982
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 paletinensis</i>	Anand <i>et al.</i> , 1983
	<i>Acanthamoeba royreba</i>	Tyndall et Domingue, 1982
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Kilvington et Price, 1990
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Hagele <i>et al.</i> , 2000
	<i>Echinamoeba exudans</i>	Fields <i>et al.</i> , 1990a
	<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	Rowbotham, 1986
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	Wadowsky <i>et al.</i> , 1988
	<i>Naegleria australiensis</i>	Harf et Monteil, 1988
	<i>Naegleria fowleri</i>	Newsome <i>et al.</i> , 1985
	<i>Naegleria jadini</i>	Rowbotham, 1980
	<i>Naegleria lovaniensis</i>	Tyndall et Domingue, 1982
	<i>Naegleria gruberi</i>	Rowbotham, 1980
	<i>Platyamoeba placida</i>	Kuroki <i>et al.</i> , 1998b
	<i>Sccamoeba</i> sp.	Rohr <i>et al.</i> , 1998
Ciliés	<i>Vahlkampfia jugosa</i>	Rowbotham, 1986
	<i>Vexillifera</i> sp.	Kuroki <i>et al.</i> , 1998a
	<i>Willaertia</i>	Molmeret, 2001
	<i>Cyclidium</i> sp.	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

Ces relations espèce- voir souche-spécifiques peuvent apporter des éléments de compréhension sur la dominance de certaines sous-populations de légionelles en présence de différentes espèces amibiennes. Les interactions entre amibes et légionelles se caractérisent par deux phénomènes : l'internalisation des bactéries dans les protozoaires et la multiplication intracellulaire. Plusieurs auteurs suggèrent que le phénomène d'internalisation dans les amibes est dépendant de l'espèce d'amibe alors que le taux de multiplication des légionelles intra-amibienne dépend de l'espèce de légionelle (King *et al.*, 1991; Bozue et Johnson, 1996; Gao *et al.*, 1997; Harb *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1999; Harb *et al.*, 2000; Steinert *et al.*, 2002; Declerck *et al.*, 2007a). Cette relation étroite se caractérise par la présence dans le génome des légionelles d'un grand nombre de séquences eucaryotes révélant une coévolution de ces micro-organismes (Gomez-Valero *et al.*, 2009).

Les amibes, et les protozoaires de manière plus générale, apportent aux légionelles qui les infectent, un support de prolifération, une protection contre des conditions environnementales défavorables, contre la présence de désinfectants ou d'antibiotiques ainsi qu'une plus grande capacité de persistance dans l'environnement (Barbaree *et al.*, 1986; Abu Kwaik *et al.*, 1998; Atlas, 1999; Brown et Barker, 1999; Bouyer *et al.*, 2007). Vandenesch *et al.* (1990) montrent par microscopie électronique que la multiplication intracellulaire des légionelles dans les amibes entraîne le stockage intracellulaire de poly-hydroxybutyrate (réserve d'énergie) chez les légionelles leur permettant une plus grande persistance dans des environnements pauvres en nutriments.

Dans l'environnement, les légionelles doivent souvent faire face à des conditions environnementales non optimales pour leur développement : carence nutritionnelle,

variation de température, faible teneur en oxygène... Ces conditions induisent un phénomène de stress cellulaire. Pour survivre, les légionelles modifient leur phénotype et deviennent non cultivables. Cet état, appelé VBNC (Viable But Non Cultivable) est réversible, la cultivabilité des bactéries peut être retrouvée en présence d'amibes (Steinert *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2007; Alleron *et al.*, 2008).

4.4. NOTION DE RESEAU TROPHIQUE

4.4.1. NATURE DES INTERACTIONS ENTRE MICRO-ORGANISMES

Un écosystème est défini comme un ensemble dynamique au sein duquel interagissent à divers degrés des facteurs biotiques et abiotiques. Ces deux ensembles entretiennent de nombreux types d'interactions différents. Une interaction biotique désigne un processus impliquant des échanges ou interactions réciproques entre plusieurs micro-organismes dans un écosystème ; une interaction abiotique représente l'influence de l'ensemble des facteurs physico-chimiques d'un écosystème sur les êtres vivants coexistants dans ce système (Odum et Barrett, 1953; Wolff, 2002; Kuramitsu *et al.*, 2007; Haruta *et al.*, 2009).

Si une interaction biotique a lieu entre deux ou plusieurs individus d'espèces différentes alors elle sera qualifiée d'interspécifique. Inversement, si cette interaction a lieu entre deux ou plusieurs individus d'une même espèce, elle sera qualifiée d'intraspécifique. On peut distinguer les effets positifs (commensalisme, mutualisme) des effets négatifs (amensalisme, compétition, prédation) ou encore des effets neutres (absence d'effet) que certains individus ou populations peuvent avoir sur la croissance ou la survie d'autres entités (Figure 1-18).

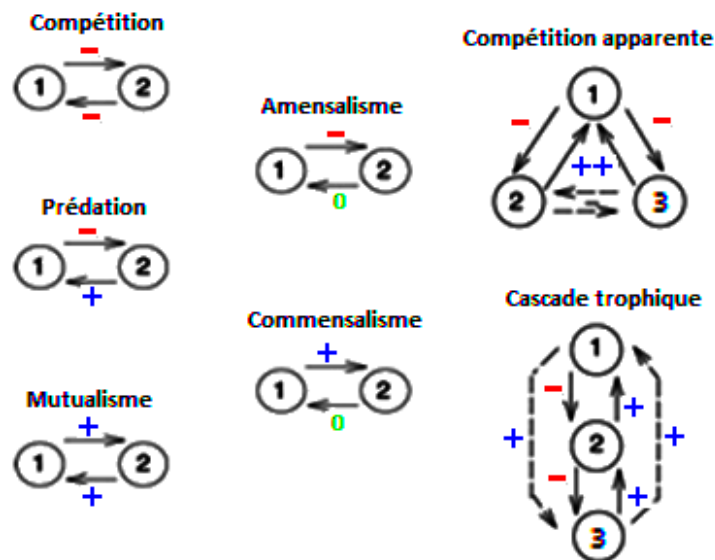


Figure 1-18: Différents types d'interactions directes et indirectes possibles entre deux individus (d'après Morin, 2011).

Les signes correspondent au type d'interaction (positive, négative ou neutre) entre les deux individus.

Un effet positif désigne la stimulation de la croissance cellulaire, un effet négatif désigne une inhibition de la croissance ou une stimulation de la mort cellulaire (Fredrickson, 1977). Ces interactions entre différentes entités peuvent être le fruit de plusieurs phénomènes biologiques. On distingue alors des interactions de type directes et indirectes (Fredrickson,

1977; Martin, 2002; Kuramitsu *et al.*, 2007). Les interactions directes impliquent obligatoirement un contact physique entre les individus concernés. Ce type d'interaction est donc réservé au parasitisme et à la prédation. Les interactions indirectes correspondent à une modification par un individu X de l'environnement dans lequel évolue l'individu Y. Il peut s'agir de la sécrétion d'une substance particulière qui favorise ou défavorise la croissance d'un individu, ou encore de la consommation de certaines ressources nutritives entraînant une carence nutritionnelle pour l'autre individu. L'environnement est un intermédiaire obligatoire dans ce type d'interaction (Fredrickson, 1977; Martin, 2002; Kuramitsu *et al.*, 2007).

- La **compétition** est une interaction indirecte définie comme la demande simultanée par deux ou plusieurs organismes d'une ressource environnementale limitée, comme un élément nutritif, l'espace vitale, ou la lumière (Schaible et Kaufmann, 2005; Wintermute et Silver, 2010). Ces dynamiques de communauté régies par les conditions de compétition sont observées dans toutes sortes de milieux (Snaidr *et al.*, 1997; Hery *et al.*, 2005).
- La **prédation** correspond à un type d'interaction directe et conflictuelle pour laquelle la relation est négative pour l'un des individus mais positive pour l'autre. La prédation permet de réguler l'effectif des micro-organismes, de recycler la biomasse microbienne et de modifier les équilibres populationnels dans la communauté (Martin, 2002; Schaible et Kaufmann, 2005; Wintermute et Silver, 2010). Dans le sol, de nombreux taxons bactériens appartenant aux actinobactéries ou aux protéobactéries ont été décrits comme des prédateurs d'autres bactéries et de champignons (Zeph et Casida, 1986).
- Dans le cas du **mutualisme**, les deux individus tirent profit de cette interaction indirecte (Schaible et Kaufmann, 2005; Wintermute et Silver, 2010). Dans le compost, deux bactéries thermophiles vivent en symbiose et ne peuvent être cultivées séparément (Watsuji *et al.*, 2006). *Bacillus* sp. fournit à *Symbiobacterium thermophilum* (Firmicutes) du CO₂ issu de sa respiration. Ce CO₂ permet à *S. thermophilum* de compenser son absence d'anhydrase carbonique, enzyme permettant différents processus comme la photosynthèse, la respiration, l'homéostasie du pH et le transport d'ions. L'intérêt de *Bacillus* sp. à vivre en symbiose avec *S. thermophilum* est que ce dernier cataboliserait différents composés du compost, inhibiteurs de *Bacillus* sp.
- L'**amensalisme** est une interaction indirecte qui a un effet négatif sur l'un des individus mais aucun effet sur l'autre. L'amensalisme repose sur une modification physique ou chimique du milieu, et dans le dernier cas il implique souvent la libération de composés toxiques (Schaible et Kaufmann, 2005; Wintermute et Silver, 2010). C'est le cas de *Lactobacillus plantarum* qui synthétise une substance « Bacteriocin-like » inhibitrice de la croissance d'*Escherichia coli* et de *Listeria monocytogenes* dans le lait, deux espèces non compétitrices de *Lactobacillus plantarum* (Aguilar *et al.*, 2011a).
- Le **commensalisme** est une interaction indirecte pour laquelle les effets positifs ne s'exercent que sur l'un des deux individus (Schaible et Kaufmann, 2005; Wintermute et Silver, 2010). *Escherichia coli*, bactérie aérobie facultative, consomme l'oxygène dans le tractus intestinal, le rendant anaérobie. D'autres bactéries appartenant au genre *Bacteroides*, anaérobies strictes profitent de cet appauvrissement en oxygène pour se développer dans ce milieu (Mastropaolo *et al.*, 2005).

4.4.2. RESEAU TROPHIQUE

Tous ces types de relations, directes ou indirectes, entre les individus et impliquant, par la sécrétion ou la consommation de différentes substances, l'environnement, définissent la notion de réseau trophique. Un réseau trophique est dépendant de la circulation de l'énergie et des transferts de la matière entre les différents organismes. Un écosystème aquatique produit constamment de la matière vivante. Celle-ci est progressivement transformée en matière organique, qui est elle-même ensuite lentement minéralisée, en partie ou en totalité.

D'une manière schématique, un écosystème aquatique peut être divisé en trois compartiments biologiques (Figure 1-19).

Les **producteurs primaires** sont essentiellement les végétaux qui utilisent la lumière solaire comme source d'énergie pour fabriquer, par photosynthèse, les matières organiques dont ils ont besoin pour croître. Les organismes photosynthétiques consomment le gaz carbonique dissous dans l'eau, les nutriments tels que l'azote, le phosphore et la silice, ainsi que divers autres constituants minéraux, et rejettent de l'oxygène.

Les **consommateurs** sont, soit des herbivores stricts, comme certaines espèces du zooplancton, qui se nourrissent de phytoplancton ou certaines espèces d'invertébrés et de poissons qui se nourrissent d'algues et d'autres végétaux fixés sur le fond. Ce sont également des espèces omnivores consommatrices de végétaux, de zooplancton et autres invertébrés ou encore des espèces strictement carnivores, comme certains gros poissons qui se nourrissent des plus petits, certains oiseaux et petits mammifères. Ces animaux respirent en consommant l'oxygène produit par les plantes et rejettent du gaz carbonique.

Les **décomposeurs** sont des micro-organismes, comme les bactéries aérobies ou les champignons, qui utilisent comme nutriments toute la matière organique morte et biodégradable présente dans le milieu aquatique, qu'elle soit produite par les autres organismes (telles les sécrétions animales) ou issue de leur décomposition, ou encore qu'elle provienne d'eaux de ruissellement, d'eaux infiltrées dans les sols ou d'eaux usées rejetées par les hommes. Pour dégrader ces matières organiques, les décomposeurs utilisent l'oxygène produit par les plantes.

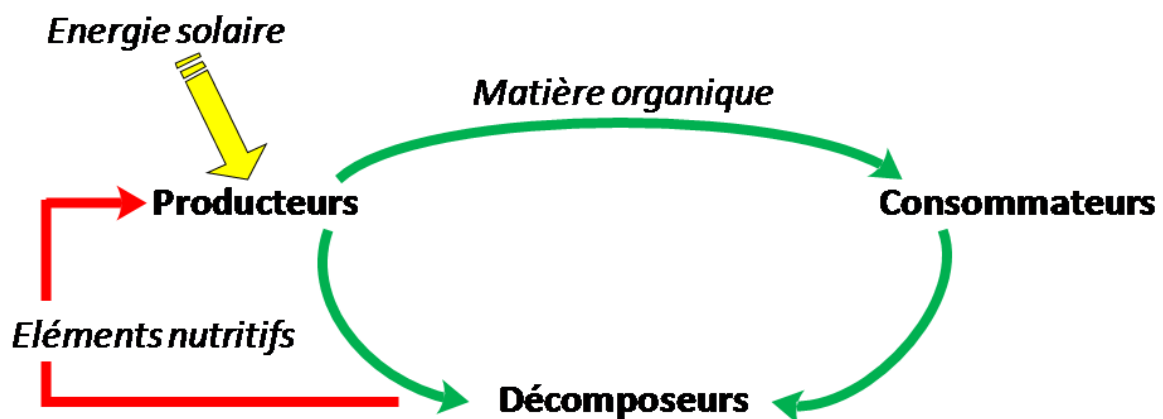


Figure 1-19: Cycle de la matière et compartiments biologiques d'un écosystème aquatique.

Le rôle des décomposeurs, bactéries et champignons, est prépondérant car en décomposant les matières organiques, ils participent à l'épuration des écosystèmes aquatiques. En outre, en transformant les matières organiques complexes en substances minérales simples dont les végétaux ont besoin, c'est-à-dire en recyclant les matières organiques, les décomposeurs referment la chaîne trophique qui, des producteurs, mène aux consommateurs puis aux décomposeurs.

Du fait de leur abondance (10^6 à 10^7 cellules/mL) et de leur rôle majeur dans les transferts de matière et des flux d'énergie, les micro-organismes constituent des acteurs essentiels au sein des écosystèmes aquatiques (Amblard *et al.*, 1998). Les bactéries et les champignons, qui utilisent de manière intensive la matière organique dissoute, les protistes qui consomment ces bactéries, et les virus, responsables d'une mortalité non négligeable des micro-organismes, ont été intégrés au sein des réseaux trophiques classiques pour former des réseaux d'interactions de plus en plus complexes (Lacroix et Danger, 2008). Les bactéries interviennent dans de nombreux cycles biogéochimiques via la dégradation de déchets végétaux et animaux et permettent la réattribution des nutriments vers les niveaux trophiques supérieurs (Amblard *et al.*, 1998). Leur abondance est principalement contrôlée par la ressource nutritive, le broutage des protozoaires et par la lyse virale (Fuhrman, 1999; Hahn et Höfle, 2001; Jurgens et Matz, 2002; Nichols, 2003; Personnic *et al.*, 2006). Ces mécanismes, appelés « boucle microbienne » et « boucle virale » (Figure 1-20) peuvent être responsables de l'élimination journalière de quelque % à la quasi-totalité des procaryotes (Lacroix et Danger, 2008). En outre, il semble que la présence de prédateurs flagellés stimule la mortalité bactérienne induite par les virus (Lacroix et Danger, 2008).

Le réseau trophique microbien transforme la matière organique dissoute ou particulaire en biomasse bactérienne, transférée ensuite via les protozoaires aux niveaux trophiques supérieurs (Jurgens et Matz, 2002). Le broutage des bactéries par les protozoaires permet une régulation de l'abondance bactérienne ainsi que de la structure des communautés bactériennes. En effet, les populations bactériennes présentes dans un écosystème résistent à la pression de sélection induit par les phénomènes de broutage (Hahn et Höfle, 2001; Pernthaler, 2005). Certains caractères phénotypiques des bactéries ont été interprétés comme des adaptations des micro-organismes à la prédation (Figure 1-21). La lyse virale induit la libération de matière organique dissoute qui devient alors de nouveau disponible aux bactéries. Outre leur contribution au contrôle de l'abondance bactérienne, les virus devraient avoir une influence sur la structure des communautés bactériennes en raison de la forte spécificité de leur prédation (Fuhrman, 1999; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004; Personnic *et al.*, 2006).

La structure des communautés microbiennes est donc régulée premièrement par des paramètres abiotiques, notamment la ressource nutritive. Ces paramètres abiotiques dépendent entre autre, de l'activité des différents organismes présents dans l'écosystème, de la géomorphologie des milieux aquatiques (caractéristiques des eaux, nature des sols, taille du bassin versant, débit...), des événements météorologiques ainsi que des facteurs liés à l'activité humaine. Un milieu riche en nutriment contient naturellement un plus grand nombre d'espèces qu'un milieu pauvre, cependant une trop forte concentration en nutriments va avoir un effet négatif sur la diversité. Ce phénomène est appelé paradoxe de l'enrichissement et a notamment été étudié sur des espèces végétales issues d'un milieu riche en azote (Thurston *et al.*, 1976; Jenkinson, 1989). Les communautés microbiennes sont aussi influencées par des paramètres biotiques intervenant dans les boucles microbiennes et

virales. Cet ensemble de facteurs régule non seulement, l'abondance des communautés mais aussi leur structure et leur diversité.

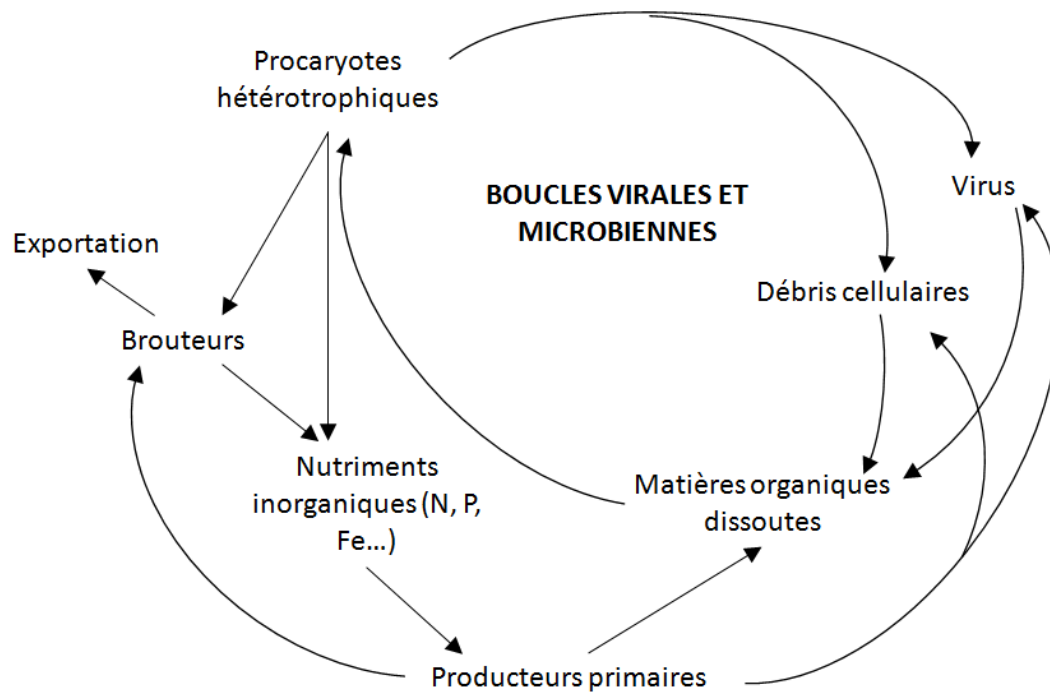


Figure 1-20: Boucle virale et microbienne (d'après Fuhrman, 1999).

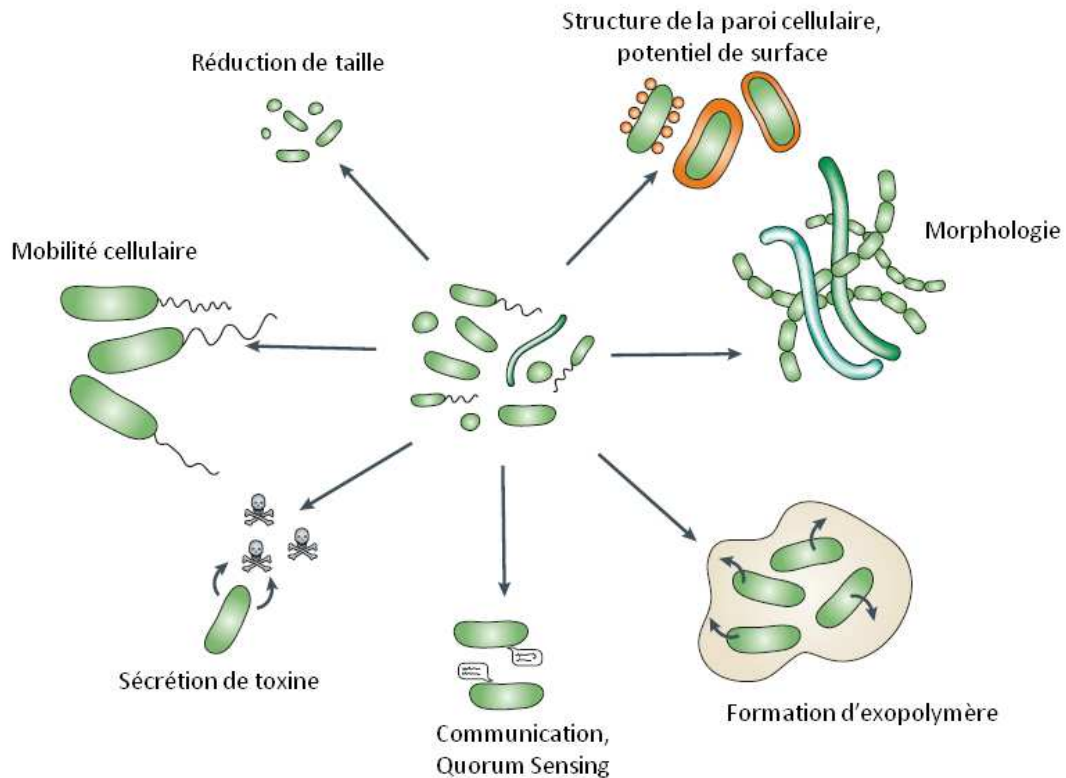


Figure 1-21: Propriétés phénotypiques des bactéries aquatiques capables d'échapper à la prédation (d'après Pernthaler, 2005).

5. ECOLOGIE ET REPOSE DES LEGIONELLES EN PRESENCE DE BIOCIDES CHLORES

La présence des légionelles dans les milieux artificiels susceptibles de générer des aérosols contaminés crée un risque sanitaire pour les populations environnantes. Un certain nombre de textes réglementaires définissent les procédures à suivre afin de maîtriser les développements de ce germe pathogène dans les installations (voir §2.3). Des procédures de désinfections (physiques ou chimiques) peuvent être employées pour réduire ou maintenir des taux de colonisation des circuits en légionelles acceptables, c'est-à-dire en dessous des seuils fixés par la réglementation. Qu'ils soient physiques ou chimiques, les traitements employés impactent l'ensemble de la flore microbienne des réseaux, à la fois la phase planctonique et la phase fixée, le biofilm. L'effet de la modification de l'environnement physico-chimique par les procédés de désinfection, est ressenti à la fois sur l'ensemble de l'écosystème aquatique, mais aussi sur les réponses cellulaires des micro-organismes présents dans les réseaux. Dans ce chapitre, seront abordés les différents traits relatifs à l'utilisation des procédés de désinfection, et notamment les biocides chlorés, dans les milieux artificiels :

- les différents procédés de désinfection et leur mécanisme d'action sur les micro-organismes ;
- l'efficacité des biocides chlorés ;
- la réponse cellulaire des micro-organismes aux biocides chlorés ;
- la réponse écosystémique aux biocides chlorés.

5.1. LES DIFFERENTS PROCEDES DE DESINFECTION DES RESEAUX ET LEUR MODE D'ACTION SUR LES MICRO-ORGANISMES

Différents modes de décontamination des réseaux d'eau, tels que les réseaux de distribution d'eau potable, les réseaux d'eaux chaudes sanitaires ou encore les eaux de TAR, peuvent être utilisés afin de limiter la prolifération et la diffusion de micro-organismes et notamment ceux pathogènes pour l'homme comme les légionelles. Parmi les traitements existants, les modes de désinfection par voie chimique et physique sont les plus largement utilisés. Dans les réseaux d'eau chaude ou de distribution d'eau potable ainsi que dans les TAR, les traitements les plus répandus sont les traitements chimiques utilisant le chlore et ses dérivés, notamment le chlore libre et les chloramines (Gaudy et Gaudy, 1980; Gyurek et Finch, 1998; Ozlem Sanli-Yurudu *et al.*, 2007; Black & Veatch, 2010).

En Australie, la désinfection des eaux alimentant les réseaux de distribution d'eau potable est effectuée selon deux modes de traitement. Les eaux de surface sont traitées par du chlore libre associé ou non à un processus de filtration. Les eaux souterraines subissent un traitement par aération suivi d'une chloration avant de rejoindre le réseau. Un traitement aux chloramines est également utilisé directement dans le réseau afin de maintenir un résiduel (Bartram *et al.*, 2009). En Grande Bretagne l'eau potable est alimentée à 70% par de l'eau de surface et à 30% par de l'eau souterraine. Un traitement au chlore libre associé à différents traitements physiques (filtration, floculation, sédimentation) est utilisé pour la désinfection des eaux de surface. Des traitements à l'ozone ou aux ultraviolets sont

également observés dans différents systèmes en complément du traitement traditionnel au chlore libre. Les eaux souterraines sont traitées uniquement par du chlore libre (Bartram *et al.*, 2009). Aux Etats Unis, le chlore est le principal désinfectant utilisé pour l'assainissement des réseaux d'eau potable. En 2005, environ 30% des systèmes de distribution étaient également traités par des chloramines pour le maintien d'un résiduel actif dans le réseau (Seidel *et al.*, 2005).

5.1.1. LES TRAITEMENTS PHYSIQUES

Deux types de traitements physiques sont utilisés pour la désinfection des eaux de réseau : le choc thermique et la désinfection par les ultraviolets.

5.1.1.1. CHOC THERMIQUE

La désinfection physique de l'eau par des chocs thermiques consiste à augmenter la température du réseau jusqu'à 70°C puis à rincer l'ensemble du réseau pendant 30 minutes. L'efficacité de cette méthode de désinfection est limitée puisqu'une recolonisation des réseaux est observée quelques mois après le traitement (Lin *et al.*, 1998). Les bactéries thermotolérantes du genre *Legionella* sont particulièrement plus résistantes à ce traitement que les autres micro-organismes (LeChevallier et Au, 2004). Sanden *et al.* (1989) ont montré que le temps de contact nécessaire pour abattre un log de *L. pneumophila* dépend de la température de désinfection appliquée : il faut 2500 minutes à 45°C, 380 minutes à 50°C, 5 minutes à 60°C et une minute à 70°C pour observer un log d'abatement.

La désinfection des réseaux par choc thermique est peu utilisée car cette méthode est inadaptée à des grandes structures. Une forte consommation d'énergie est associée à l'utilisation de ce traitement, la thermo-résistance des matériaux doit être prise en compte et ce système de désinfection engendre une production de matière organique à partir de la biomasse dégradée qui constitue une source potentielle de nutriments pour les micro-organismes (Blanc *et al.*, 2005; Temmerman *et al.*, 2006).

5.1.1.2. TRAITEMENT PAR RAYONS ULTRAVIOLETS

Les méthodes de désinfection par rayonnements ultraviolets consistent à irradier les eaux par une lumière à 254 nm. Ces UV perturbent la synthèse de l'ADN des micro-organismes par la production de dimères de thymine dans l'ADN qui inhibent la réplication de l'ADN (Figure 1-22) (Lin *et al.*, 1998; USEPA, 1999).

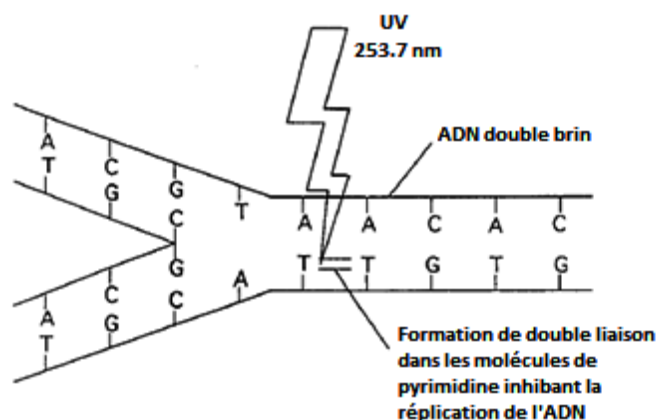


Figure 1-22: Dommages de l'ADN produits par les UV (d'après USEPA, 1999).

Un certain nombre d'étude ont montré que la désinfection par les UV n'était pas efficace pour maîtriser la concentration en légionelles dans des réseaux d'eaux chaudes sanitaires (Liu *et al.*, 1995; Oguma *et al.*, 2004; Langmark *et al.*, 2005; Langmark *et al.*, 2007). L'efficacité de ce traitement est limitée par le fait que les UV montrent une faible pénétration dans les biofilms, leur activité est donc limitée aux micro-organismes planctoniques (Lin *et al.*, 1998). Les méthodes de désinfection par rayons ultraviolets ne sont utilisables que pour des eaux claires et peu turbulentes (Kim *et al.*, 2002).

Tully (1991) a démontré la possible présence d'un plasmide d'une taille de 36 MDa chez *L. pneumophila* qui lui conférerait une meilleure résistance aux rayons UV. L'auteur émet l'hypothèse que ce plasmide permet l'expression d'un système de réparation de l'ADN lésé par les rayons UV. Plus récemment, Oguma *et al.* (2004) ont réalisé une étude sur la photoréactivation de *L. pneumophila* après exposition aux UV. Cette espèce présente une meilleure capacité de photoréactivation qu'*Escherichia coli*, bactéries indicatrices de contamination fécale dans les réseaux d'eau. La photoréactivation des légionelles serait associée à une complète réparation des dimères de pyrimidine entraînant une récupération rapide de leur taux de survie dans les réseaux.

5.1.2. LES TRAITEMENTS CHIMIQUES

D'après Maillard (2002), l'efficacité des biocides dépend fortement du type de micro-organisme considéré, voir même des souches au sein d'une même espèce (Figure 1-23). L'action des biocides est également influencée par leurs conditions d'utilisation : le pH, la concentration en biocide et le temps de contact avec les micro-organismes, la capacité du biocide à pénétrer à travers la membrane cellulaire, la présence de matière organique, le type cellulaire, l'état physiologique des cellules et les conditions de croissance (sessile, planctonique, intracellulaire) sont autant de paramètres potentiels pouvant nuancer l'efficacité d'un biocide (Brown *et al.*, 1990; Denyer, 1995; Russell, 2003).

Les biocides peuvent être répartis en quatre familles en fonction de leur mode d'action (biocides électrophiles, lytiques, protonophores ou oxydants) (Table 1-4) (Chapman, 2003). Les biocides chlorés appartiennent à la famille des biocides oxydants. Ne seront mentionnés dans cette synthèse bibliographique que les biocides chlorés appartenant à cette famille.

Table 1-4: Familles des biocides et leurs mécanismes d'action (d'après Chapman, 2003).

BIOCIDES			
Réactions électrophiles		Réaction avec les membranes	
OXYDANTS	ELECTROPHILES	LYTIQUES	PROTONOPHORES
• Halogènes ; • Peroxydes ; • Biocides chlorés ; • Acide peracétique.	• Formaldéhyde ; • Isothiazolones ; • Bronopol ; • Cuivre ; • Mercure ; • Argent.	• QAC ; • Biguanides ; • Phénols ; • Alcools.	• Parabènes ; • Acides faibles (acide sorbique et benzoïque) ; • Pyrithione.
MECANISMES D'ACTION			
• Oxydation des composés organiques par des radicaux	• Réaction covalente avec les nucléophiles cellulaires pour inactiver les enzymes • Production de radicaux libres	• Action sur les membranes cationiques (chlorhexidine, QAC) • Perturbation de la membrane • Lyse cellulaire rapide	• Perturbation du maintien du pH • Acidification de la cellule • Perturbation du métabolisme via le transfert de protons à travers la membrane

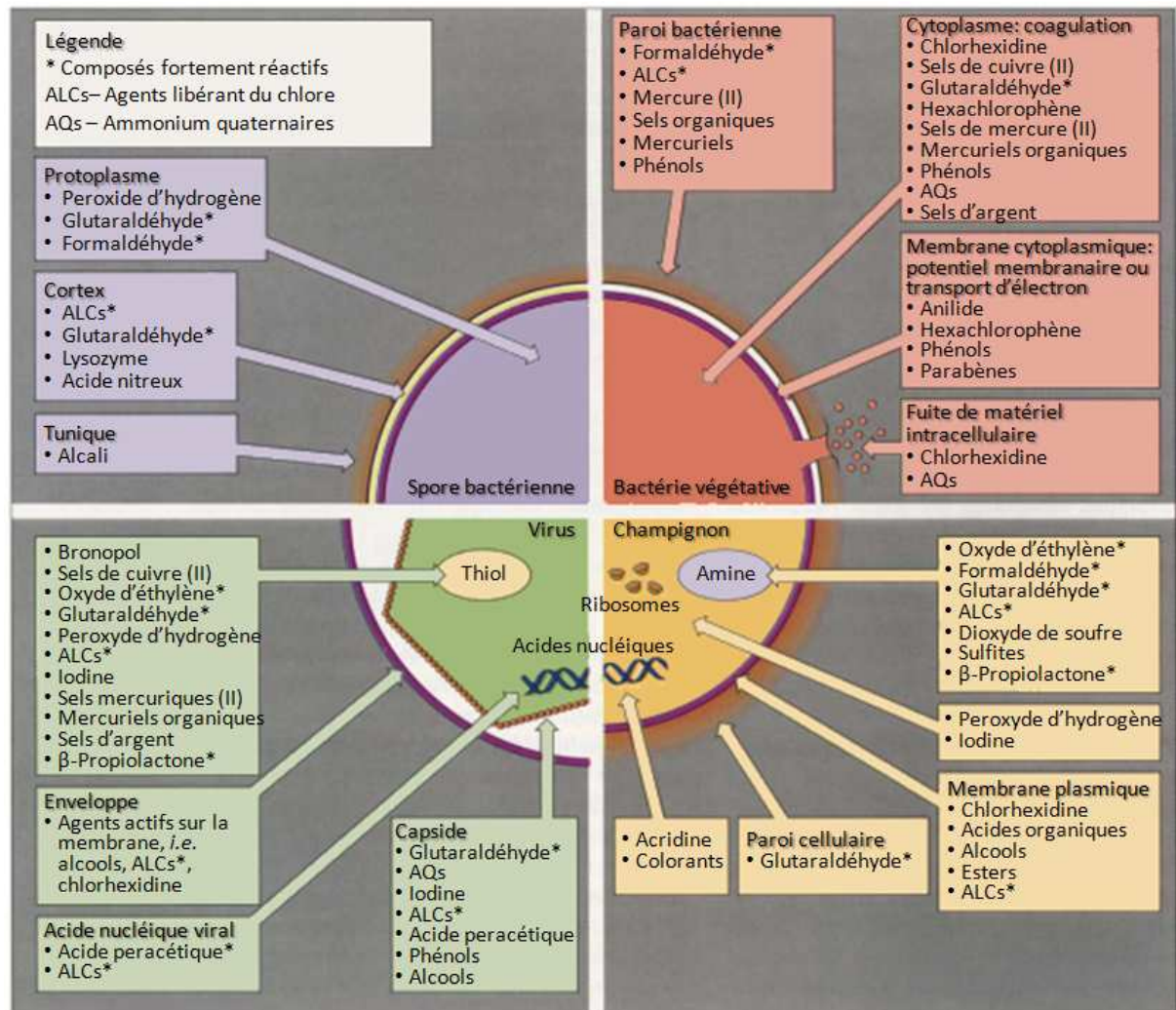


Figure 1-23: Mécanismes d'inactivation de différents micro-organismes par les biocides (d'après Doyle *et al.*, 2006).

Les mécanismes d'action des biocides chlorés sont aujourd'hui peu connus en raison de l'absence de cible cellulaire spécifique. Les biocides agissent sur un ou plusieurs sites cellulaires (paroi bactérienne, membrane cellulaire, cytoplasme...) (Malato *et al.*, 2009). Le chlore est une substance électronégative, présentant un fort pouvoir oxydant, capable de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont les radicaux libres réagissent de manière destructrice sur les composés cellulaires et induisent un stress oxydant.

5.1.2.1. LE STRESS OXYDANT

L'exposition des cellules aux agents chimiques et physiques peut entraîner une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species » ou ROS) qui aboutit à un stress oxydant. Les radicaux libres sont des ROS, ils agissent de manière destructrice sur les composés cellulaires en arrachant un ou plusieurs électrons aux éléments constitutifs des cellules (Halliwell, 2006). Ce sont des molécules très réactives, oxydantes ou réductrices, dont on distingue deux espèces principales (Favier, 2003):

- les radicaux libres primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron : l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$. Ils sont produits, par exemple, par

des rayonnements ionisants, de hautes températures. Leur origine peut également être endogène, ce sont des sous-produits du métabolisme normal de l'oxygène.

- les radicaux libres secondaires se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

D'autres espèces dérivées de l'oxygène, appelées espèces actives de l'oxygène, ne sont pas des radicaux libres mais peuvent être précurseurs de ces molécules. Il s'agit par exemple de l'oxygène singulet $^1\text{O}^2$ ou du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Les organismes ont en leur possession des mécanismes de défense contre les radicaux libres : les antioxydants. Parmi ces antioxydants, la superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine ubiquitaire qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. La glutathion peroxydase (GSH-peroxydase) catalyse la transformation des hydroperoxydes lipidiques en alcool ($\text{ROOH} \rightarrow \text{ROH}$) et la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$) (Figure 1-24). Dans des conditions physiologiques normales, ce système est en équilibre, les ROS sont contrôlées par les antioxydants.

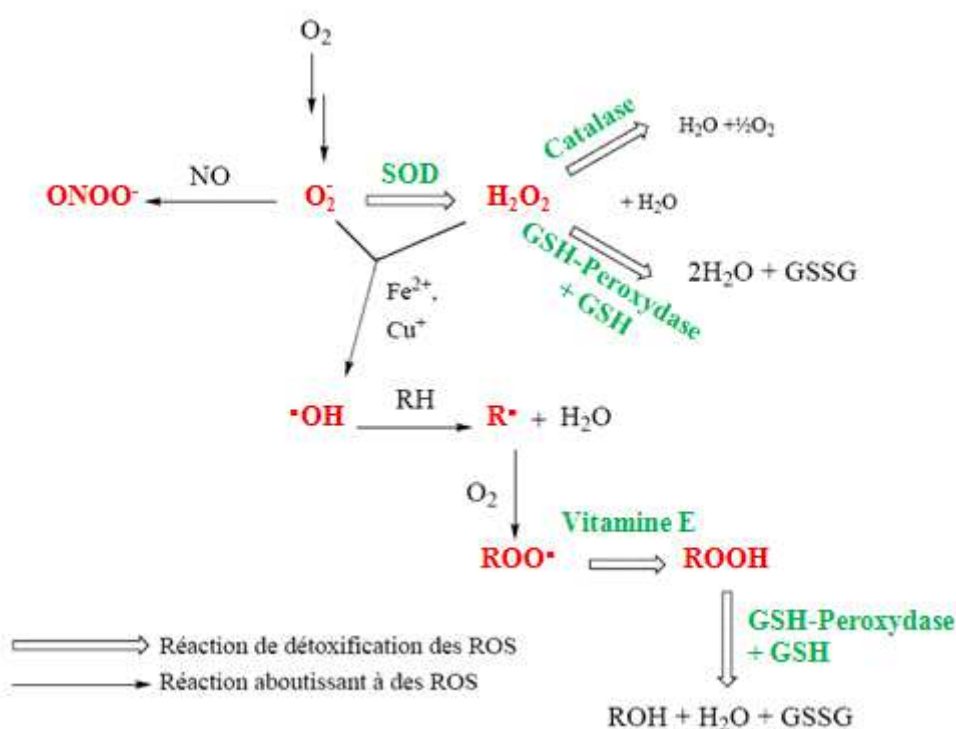


Figure 1-24: Les espèces réactives de l'oxygène et leur système de détoxification.

En cas de déséquilibre, c'est-à-dire, en cas d'exposition des cellules à des agents chimiques ou physiques, une situation de stress oxydant est observée (Sies, 1997). En situation de stress oxydant, les cellules sont sujettes à la toxicité des ROS qui peuvent réagir avec différents composants cellulaires :

- Les protéines (Figure 1-25) : par attaque radicalaire des acides aminés (et plus particulièrement ceux contenant des groupements sulfhydryles), les protéines sont oxydées entraînant des coupures, l'apparition de ponts disulfures, l'augmentation de leur hydrophobicité... Suite à ces modifications, les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques (Stadtman, 1993; Levine *et al.*, 1994; Cabiscol *et al.*, 2000; Maller *et al.*, 2007).

- Les lipides (Figure 1-26) : les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$) capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, puis oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne : le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Ce mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras membranaires conduit à la formation d'hydroperoxydes (ROOH) instables. Il est responsable de la diminution de la fluidité membranaire et de l'altération du fonctionnement des membranes (Spiteller, 1998; Maller *et al.*, 2007).
- L'ADN (Figure 1-27): l'attaque radicalaire de l'ADN par les ROS entraîne l'oxydation des bases azotées, des riboses et désoxyriboses ainsi que des cassures de l'ADN double ou simple brin et la formation de pont disulfure (Favier, 2003; Evans *et al.*, 2004). Les conséquences possibles de ces lésions sont une inhibition de la réplication, un mésappariement de bases pendant la réplication et un impact sur la transcription des gènes (Croteau et Bohr, 1997; Evans *et al.*, 2004).

Les biocides chlorés sont des oxydants pouvant générer des radicaux hydroxyles ($\text{OH}^\bullet$) qui vont agir sur les bactéries en perturbant les structures et les processus métaboliques cellulaires via les mécanismes d'action décrits précédemment.

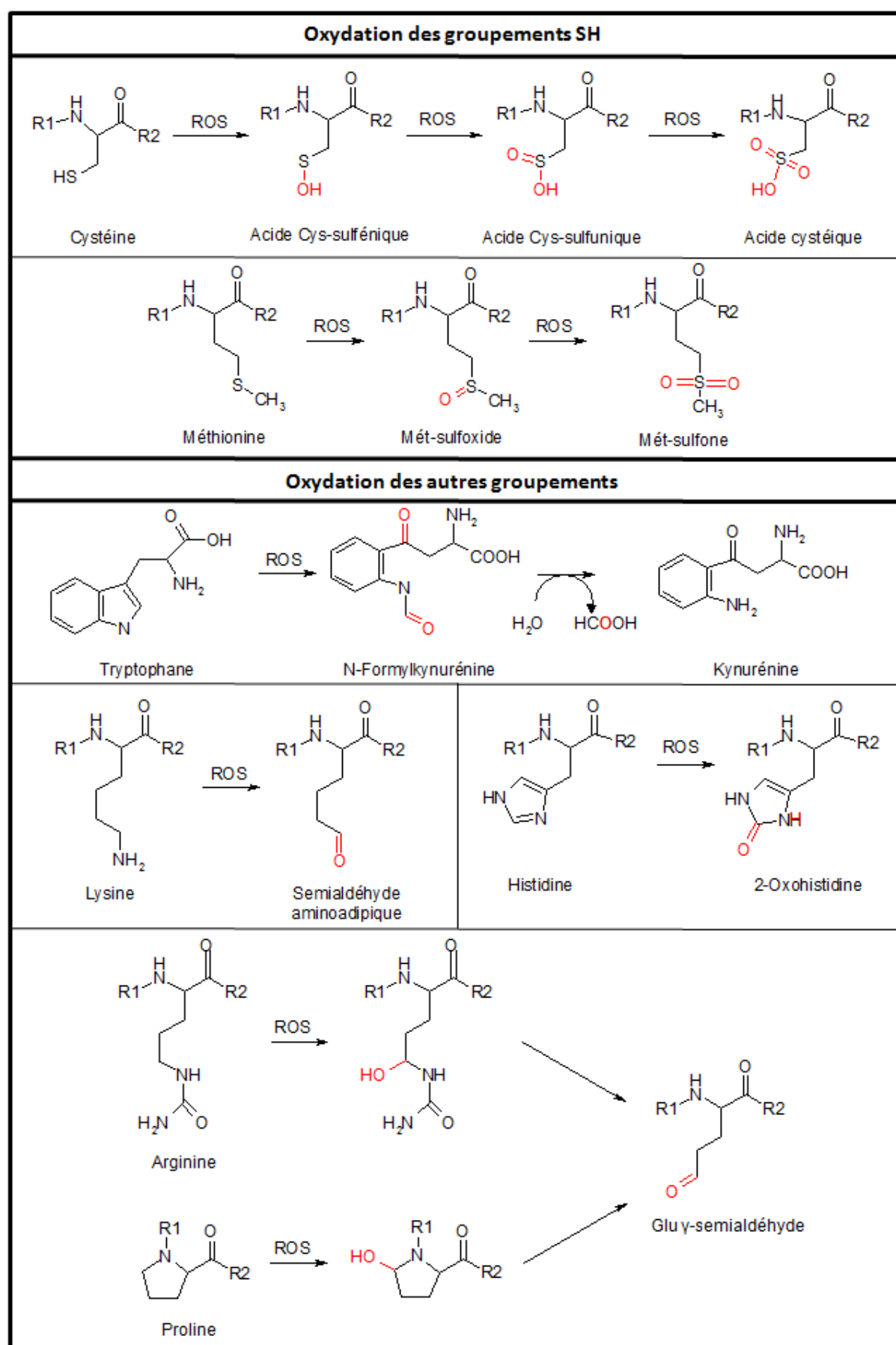


Figure 1-25: Modification de quelques acides aminés par attaque radicalaire (d'après Mogoa, 2010).

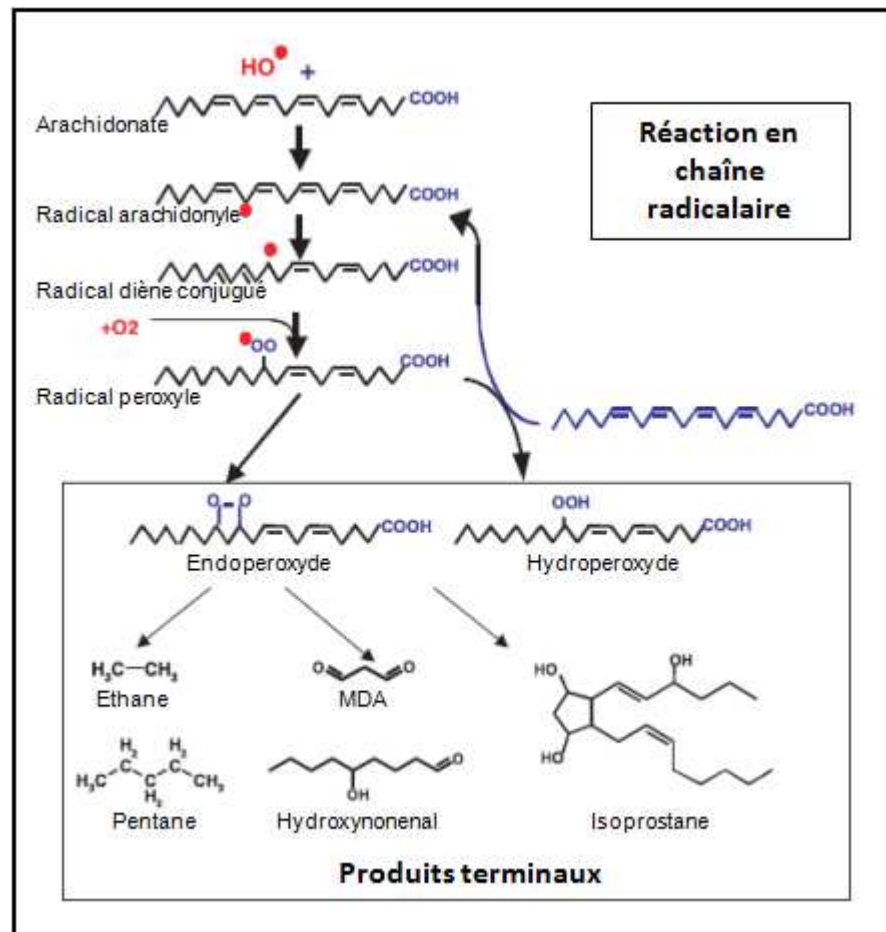


Figure 1-26: Mécanisme en chaîne de la peroxydation lipidique et nature des produits formés (d'après Favier, 2003).

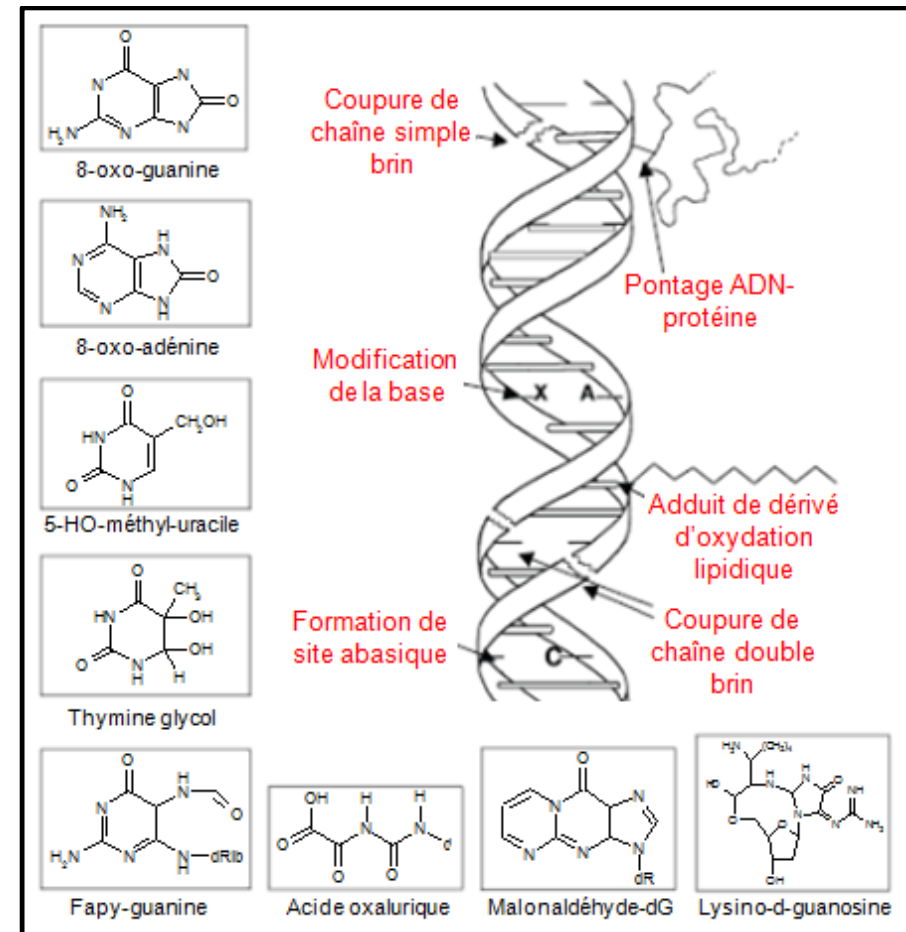
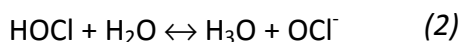
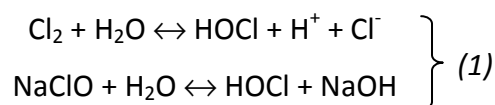


Figure 1-27: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (d'après Favier, 2003).

5.1.2.2. LE CHLORE LIBRE

La chloration est la méthode de désinfection la plus utilisée en France et dans le monde. Deux méthodes de désinfection peuvent être utilisées : la chloration massive et la chloration continue.

Le chlore utilisé pour la désinfection de réseaux d'eaux peut être injecté sous différentes formes : l'injection de chlore gazeux sous forme de dichlore Cl_2 , ou l'injection d'hypochlorite de sodium NaClO , communément appelé eau de Javel. En contact avec l'eau, ces éléments réagissent pour former de l'acide hypochloreux HOCl (1), qui se dissocie partiellement en ion hypochlorite OCl^- (2) selon la valeur du pH (un pH inférieur à 5.5 entraîne une dominance de HOCl , un pH supérieur à 8 entraîne une dominance d' OCl^-). L'ion hypochlorite se dissocie lui-même en ion Cl^- et en atome d'oxygène O (3), un oxydant très puissant.



Dans les réseaux d'eaux chaudes sanitaires, la chloration massive consiste à injecter des doses massives de chlore pendant une à deux heures pour atteindre des concentrations variant entre 20 et 50 mg/L (Lin *et al.*, 1998). Cette méthode de désinfection permet de limiter la présence de légionelles dans les réseaux pendant plusieurs mois (Lin *et al.*, 1998), et pendant plusieurs jours dans les circuits de refroidissement des centrales nucléaires. La chloration continue consiste à maintenir un résiduel de chlore libre entre 2 et 6 mg/L dans le réseau. Une concentration en acide hypochloreux de 0.4 mg/L suffit à contrôler le taux de légionelles en phase planctonique mais une concentration supérieure à 3 mg/L est nécessaire pour inactiver les légionelles contenues dans le biofilm (Lin *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002; Babi *et al.*, 2007).

Le chlore est cependant inefficace contre certains hôtes des légionelles. Les formes végétatives des amibes, telle que *Hartmannellae vermiformis*, sont capables de supporter la croissance des légionelles jusqu'à une concentration de 4 mg/L de chlore libre. La forme kystique est encore plus résistante que la forme végétative. Les kystes d'*Acanthamoebae polyphage* sont capables de résister à des concentrations en chlore supérieure à 50 mg/L pendant 18 heures (Kilvington et Price, 1990).

Bien que très utilisée, la désinfection par le chlore libre présente certaines limites (USEPA, 1999) :

- faible stabilité du chlore libre dans l'eau au cours du temps ;
- influence du pH sur l'efficacité de désinfection : efficacité optimale entre 5.5 et 7.5 ;
- grande corrosivité du chlore libre qui entraîne des dommages aux installations ;
- caractère alcalin du chlore libre qui cause des problèmes d'entartrage ;
- le dégazage du produit qui complique son utilisation ;
- formation de sous-produits dont certains cancérigènes : les trihalométhanes (THM).

Le chlore libre agit sur deux éléments essentiels des cellules : les membranes cellulaires et les constituants cytoplasmiques. Par la réaction avec les phospholipides des membranes cellulaires, le chlore affecte la perméabilité membranaire (Winterbourn *et al.*, 1992;

Spickett, 2007; Cho *et al.*, 2010). Le chlore agit également avec les protéines membranaires par des réactions d'oxydation, de substitutions et d'addition de chlore sur les acides aminés des protéines. Les cibles préférentielles du chlore sont les acides aminés contenant du soufre : méthionine, cystéine, cystine (Pattison et Davies, 2001). Cette attaque du chlore sur les protéines entraîne une inhibition des réactions enzymatiques, comme sur l'ATP synthase chez *Escherichia coli* (Barrette *et al.*, 1989; Hannum *et al.*, 1995), les enzymes impliquées dans la respiration cellulaire (Albrich et Hurst, 1982; Barrette *et al.*, 1987) ou encore l'activité ATPase des pompes à proton chez *Saccharomyces cerevisiae* (King *et al.*, 2004). Lorsque le chlore vient en contact de l'enzyme, un ou plusieurs atomes d'hydrogène de la molécule sont substitués par le chlore, entraînant la modification de sa structure et dans la plupart des cas sa dissociation ou la perte de sa fonction biologique / biochimique. Le chlore agit également, lorsqu'il a pénétré à l'intérieur de la cellule, sur les molécules d'ADN. Il réagit par oxydation avec les bases adénine, guanine et cytosine de l'ADN (Saby *et al.*, 1999; Phe *et al.*, 2004; Badouard *et al.*, 2005; Phe *et al.*, 2007). Une étude de Small *et al.* (2007) a montré que le chlore entraîne l'inhibition de 630 gènes sur 5570 étudiés chez *Pseudomonas aeruginosa*. La réaction d'oxydation du chlore avec les bases de l'ADN entraîne également la formation de chloramines qui, à leur tour, vont créer des dommages sur l'ADN (Hawkins et Davies, 2002).

5.1.2.3. LE DIOXYDE DE CHLORE

Le dioxyde de chlore (ClO₂) est un composé neutre de chlore fabriqué le plus souvent par action de l'acide chlorhydrique sur du chlorite de sodium dans un générateur spécifique :



La désinfection par le dioxyde de chlore est utilisée dans le traitement de l'eau potable, la désinfection des eaux d'égouts, les procédés industriels de traitement de l'eau, la désinfection de l'eau des tours de refroidissement (USEPA, 1999)...

Le dioxyde de chlore présente certains avantages vis-à-vis de la désinfection par rapport au chlore libre (USEPA, 1999) : sa solubilité dans l'eau est meilleure que celle de l'acide hypochloreux, son efficacité est peu affectée par le pH. Le dioxyde de chlore ne réagit pas avec la matière organique ce qui n'entraîne pas la formation de composés cancérogènes comme les THM. De plus, sa pénétration dans le biofilm est meilleure que celle du chlore. Walker *et al.* (1995) ont montré qu'un choc massif au dioxyde de chlore suivi par un traitement en continu permettait une forte réduction du biofilm.

Le dioxyde de chlore agit au niveau de la structure de la cellule et des composés intracellulaires et entraîne l'interruption de plusieurs processus cellulaires bactériens (Ogata, 2007; Wang *et al.*, 2010):

- interaction avec les protéines, les lipides membranaires, les acides aminés et l'ARN des cellules ;
- pénétration de la paroi cellulaire ;
- inhibition de la synthèse protéique...

5.1.2.4. LES CHLORAMINES

Les chloramines sont formées lors d'une réaction entre le dichlore Cl_2 et l'ammoniac NH_3 . En fonction du pH et du ratio $\text{Cl}_2:\text{N}$, trois chloramines différentes sont formées (Palin, 1950). Un pH entre 7.5 et 9 favorise la formation de monochloramine NH_2Cl (1), un pH entre 4 et 6 favorise la dichloramine NHCl_2 (2) et la trichloramine NCl_3 (3) (Figure 1-28) (Palin, 1950; Flannery *et al.*, 2006). L'efficacité de désinfection de ces trois composés n'est pas équivalente, la monochloramine est un désinfectant efficace alors que la dichloramine et la trichloramine ont des capacités de désinfection moyennes (USEPA, 1999).

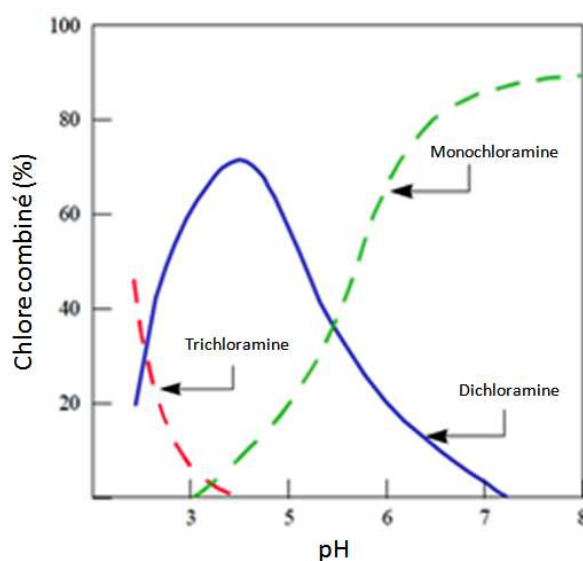


Figure 1-28: Formation des chloramines en fonction du pH (d'après Palin, 1950).

La monochloramine est un oxydant utilisé pour :

- la désinfection des eaux usées : aux Etats Unis ou à Hong Kong par exemple (Mitch et Sedlak, 2004; Qi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011) ;
- de l'eau destinée à la consommation aux Etats Unis (Kool *et al.*, 1999a; Flannery *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2006), au Canada (Poon *et al.*, 1997), en Grande Bretagne (Goslan *et al.*, 2009), en Chine (Liu *et al.*, 2009) ;
- et pour le traitement des CRF des CNPE en France.

Son mécanisme d'action est plus lent que celui du chlore libre (LeChevallier et Au, 2004) mais la monochloramine, dû à sa faible réactivité avec les polymères (LeChevallier *et al.*, 1988), est plus stable et présente une meilleure pénétration du biofilm que le chlore (Kool *et al.*, 1999a; Kool *et al.*, 1999b; Lin *et al.*, 2000). Ces mêmes études ont montré que les réseaux traités à la monochloramine présentent moins de colonisation que ceux traités au chlore libre (Kool *et al.*, 1999a; Kool *et al.*, 1999b). La monochloramine est moins réactive avec les matières organiques que le chlore, produisant moins de THM que ce dernier (Kim *et al.*, 2002).

Les mécanismes d'action de la monochloramine sur les micro-organismes sont peu connus. Des études menées par Jacangelo (1991) sur *Escherichia coli*, ont montré que la membrane bactérienne et les acides nucléiques sont peu endommagés par la monochloramine. Cependant, Lu Shih et Lederberg (1976) ont constaté que l'exposition de l'ADN de *Bacillus subtilis* à la monochloramine induit des cassures de l'ADN simple et double brin, réduit les activités de modification de l'ADN et augmente la sensibilité de l'ADN aux clivages par des endonucléases. De même, Jacangelo *et al.* (1987) ont montré que la monochloramine réagit rapidement avec les acides aminés contenant des groupements sulfhydryles (méthionine, cystéine) et le tryptophane et de manière moins rapide avec les acides aminés asparagine, acide aspartique, histidine, lysine et tyrosine. La réaction de la monochloramine avec les acides nucléiques est plus lente que celle observée avec les acides aminés, ce qui tend à expliquer l'inactivation plus lente des virus que des bactéries (Jacangelo *et al.*, 1987). Ingols (1958) avait déjà montré que la première cible de la monochloramine est les enzymes liées à la membrane bactérienne. L'inhibition par la monochloramine de certaines protéines associées à des processus métaboliques comme la respiration cellulaire et le transport membranaire entraîne l'inactivation des cellules. Les résultats obtenus par Watters *et al.* (1989) sur des cellules d'*Enterobacter cloacae* suggèrent que le chlore libre et la monochloramine réagissent avec des composés de la membrane bactérienne différents.

5.2. EFFICACITE DES BIOCIDES CHLORES SUR LES MICRO-ORGANISMES

5.2.1. DEFINITIONS

Selon l'efficacité du biocide, les effets sur les micro-organismes peuvent être de trois types : l'inactivation des bactéries (c'est à dire la mort cellulaire), l'inhibition des bactéries (les micro-organismes survivent mais il y a absence de multiplication), l'absence d'effet (les bactéries survivent et se multiplient) (Figure 1-29). On parle alors de micro-organismes sensibles, tolérants ou résistants respectivement. Historiquement, ces termes ont été définis dans le cadre clinique pour l'utilisation des antibiotiques et ont par la suite été adaptés à l'utilisation des biocides.

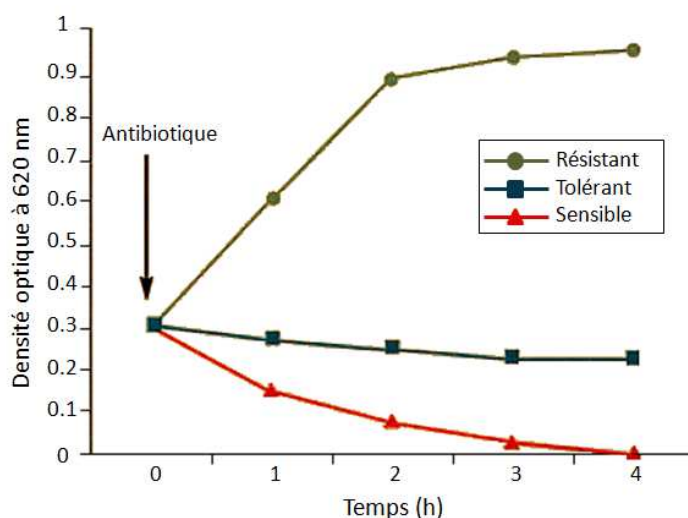


Figure 1-29: Courbes représentatives de l'effet des antibiotiques sur des souches bactériennes résistantes, tolérantes et sensibles (d'après Atkinson *et al.*, 2000).

L'effet du biocide sur les micro-organismes est dépendant de la concentration en biocide. Ainsi, une bactérie peut être résistante à une certaine concentration en biocide mais sensible à une concentration plus forte (Figure 1-30). Deux paramètres permettent de définir la sensibilité des micro-organismes en fonction de la concentration en biocide : la concentration minimale inhibitrice (« Minimal Inhibitory Concentration » ou MIC) qui correspond à la concentration en biocide permettant d'inhiber totalement la multiplication bactérienne, et la concentration minimale bactéricide (« Minimal Bactericidal Concentration » ou MBC) correspondant à la plus faible concentration de biocide capable de détruire 99.99% des bactéries.

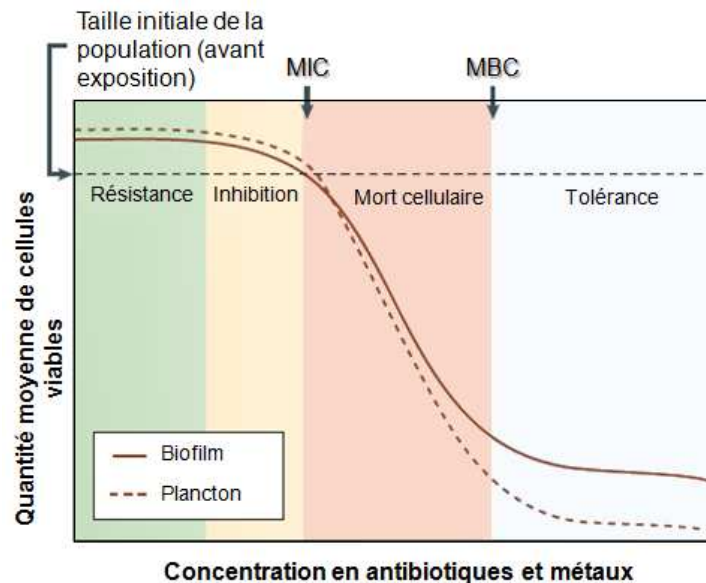


Figure 1-30: Effet de la concentration en agent antibactérien sur des micro-organismes sessiles et planctoniques. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (MIC et MBC) (d'après Harrison *et al.*, 2007a).

La résistance bactérienne se manifeste par une augmentation significative de la MIC (augmentation d'un facteur 4 à 16 par rapport à une souche standard). Il est communément admis qu'une bactérie est tolérante si le ratio MBC/MIC est supérieur ou égal à 32 (Eagle et Musselman, 1948; Sabath *et al.*, 1977; Tuomanen *et al.*, 1986; European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious, 2000; Traczewski *et al.*, 2009). Ce ratio est une valeur guide des tests normalisés de susceptibilité des bactéries aux antibiotiques (Institute, 1999).

Ces paramètres, très utilisés dans le cadre de résistance bactérienne aux antibiotiques, ont une utilisation limitée dans le cadre des biocides. Dans ce contexte, la « résistance » s'apparente à une baisse de sensibilité d'un micro-organisme à un biocide.

5.2.2. MESURE DE L'EFFICACITE D'UN BIOCIDE : LE FACTEUR C_T

Le modèle le plus communément utilisé pour décrire l'inactivation des micro-organismes par les biocides dérive des travaux de Chick (1908) et Watson (1908). Ce modèle, appelé Loi de Chick et Watson, décrit la vitesse d'inactivation des micro-organismes par les biocides oxydants en fonction de deux paramètres clés, le temps de contact avec le biocide et sa concentration :

$$\frac{dN}{dt} = -kC^n$$

avec N la concentration en micro-organismes au temps t
 C la concentration en biocide
 k le coefficient de létalité de l'espèce
 n l'ordre de la réaction

Le facteur k correspond à la sensibilité des espèces en dehors d'une exposition aux biocides. Il suit la loi d'Arrhenius :

$$k = \mathcal{A} \exp \frac{E}{R} \times T^\circ$$

avec $\mathcal{A}$ la constante d'Arrhenius à 20°C
 $\frac{E}{R}$ le facteur d'activation
et T° la température en °K

Le facteur n correspond à l'ordre de la réaction, il pondère l'activité du biocide en fonction des conditions expérimentales. Ainsi, pour $n > 1$, la cinétique de désinfection est plus affectée par la concentration en biocide que par le temps de contact. Inversement, pour $n < 1$, le temps de contact est le facteur prépondérant dans la désinfection. Dans la plupart des cas, n est égal à 1, ainsi la désactivation des bactéries est une réaction du premier ordre. La loi cinétique d'inactivation des micro-organismes s'écrit alors :

$$\ln \left(\frac{N}{N_0} \right) = -kC^t$$

avec N la concentration en micro-organismes au temps t
 N_0 la concentration en micro-organismes au temps t_0
 k le coefficient de létalité de l'espèce
 C la concentration en biocide
et t le temps de contact

L'inactivation des germes est directement proportionnelle au facteur Ct (mg.min/L), produit de la concentration en désinfectant (en mg/L) par le temps de contact (en min) nécessaire pour désactiver le micro-organisme. Divers niveaux de désactivation peuvent être atteints. Ceux-ci s'expriment souvent en réduction log :

- réduction log 1 = 90% de désactivation = $Ct_{90\%}$
- réduction log 2 = 99% de désactivation = $Ct_{99\%}$
- réduction log 3 = 99.9% de désactivation = $Ct_{99.9\%}$
- réduction log 4 = 99.99% de désactivation = $Ct_{99.99\%}$

La Loi de Chick et Watson avec son facteur Ct est la base d'autres modèles qui ne sont que des variations de cette formule (Haas et Karra, 1984). Ce modèle impliquant la concentration en biocide et le temps de contact comme les deux variables clés de l'efficacité de désinfection, est un concept important. La plupart des procédés de désinfection actuels sont basés sur ce concept. De nombreuses recherches ont été conduites sur les valeurs Ct de divers types de micro-organismes et pour divers désinfectants. Les données sur les valeurs Ct dans la littérature peuvent différer. En comparant les désinfectants, la valeur Ct doit toujours être associée avec la réduction log. A part la concentration et le temps, d'autres facteurs influencent la valeur Ct : le pH, la lumière, la température de l'eau, le mélange de

l'eau et du désinfectant. Il est donc très difficile de comparer des valeurs Ct issues de différentes expérimentations.

5.2.3. SENSIBILITE DES MICRO-ORGANISMES AUX BIOCIDES CHLORES

Le chlore et l'hypochlorite de sodium sont efficaces contre les bactéries, les virus et les champignons. Toutefois, la sensibilité des micro-organismes au chlore est variable. Certains organismes, comme *Mycobacterium avium* sont résistants au chlore, mais aussi à la monochloramine, au dioxyde de chlore et à l'ozone (Taylor *et al.*, 2000). Cette résistance est liée notamment à la structure de la membrane des mycobactéries. Le chlore et l'hypochlorite de sodium n'inhibent ni le développement de *Giardia lamblia* ni le développement de *Cryptosporidium* sp. Toutefois en synergie avec d'autre biocide, par exemple l'ozone, ils peuvent être actifs sur les oocystes de *Cryptosporidium parvum* (Corona-Vasquez *et al.*, 2002). Le dioxyde de chlore via l'inhibition de la synthèse protéique est un biocide très efficace. Le dioxyde de chlore est efficace contre les parasites *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium* sp. La meilleure protection contre ces protozoaires est la combinaison du dioxyde de chlore et de l'ozone (USEPA, 1999; LeChevallier et Au, 2004; World Health Organization, 2011). La monochloramine peut également agir en synergie avec d'autre biocide, par exemple l'ozone sur les oocystes de *Cryptosporidium parvum* (Biswas *et al.*, 2005), ou les spores de *Bacillus subtilis* (Larson et Marinas, 2003).

Les valeurs des facteurs Ct des principaux biocides chlorés sur *L. pneumophila* et *Escherichia coli* sont présentés dans le tableau ci-dessous. Bien que l'efficacité du dioxyde de chlore sur les légionelles ne soit plus à démontrer (Srinivasan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Dupuy *et al.*, 2011), aucune valeur de Ct n'a été relevée dans la littérature.

Table 1-5: Efficacité des biocides chlorés sur *Escherichia coli* et *L. pneumophila* mesurée par le facteur Ct.

Organismes	Ct (mg.min.L ⁻¹) ^a			Références bibliographiques
	Ct _{99%}	Ct _{99,9%}	Ct _{99,99%}	
Chlore				
<i>Escherichia coli</i>	0.4			Scarpino <i>et al.</i> , 1972
	0.92			Scarpino <i>et al.</i> , 1973
		0.09		Taylor <i>et al.</i> , 2000
		0.032		Helbling et VanBriesen, 2007
<i>L. pneumophila</i>			50	Swango <i>et al.</i> , 1987
Monochloramine				
<i>Escherichia coli</i>	175			Safe Drinking Water et National Research, 1987
		73		Taylor <i>et al.</i> , 2000
		18		Arnitz <i>et al.</i> , 2009
	64			Safe Drinking Water et National Research, 1987
	37			Cunliffe, 1990
<i>L. pneumophila</i>	15			Cunliffe, 1990
Dioxyde de chlore				
<i>Escherichia coli</i>		0.02		Taylor <i>et al.</i> , 2000
	0.28			Safe Drinking Water et National Research, 1987

^a Les valeurs de Ct présentées ci-dessus, sont issues de différentes expérimentations dans des conditions expérimentales variables, ces valeurs ne sont donc pas comparables.

Le dioxyde de chlore est le biocide le plus efficace sur *Escherichia coli*, suivi du chlore et de la monochloramine. Les conditions de culture (richesse du milieu, température...) influent sur la valeur du Ct. Le dioxyde de chlore et le chlore sont considérés comme les biocides les plus efficaces pour le contrôle du développement des légionelles dans des circuits d'eau sanitaire (Loret *et al.*, 2005). Bien que les chloramines soient moins efficaces que le chlore et le dioxyde de chlore (Table 1-6), ces biocides sont plus stables, leur persistance dans l'eau est donc meilleure que le chlore et le dioxyde de chlore (Symons *et al.*, 1977).

Table 1-6: Efficacité de différents biocides sur les micro-organismes (d'après Safe Drinking Water et National Research, 1987).

Biocide	Efficacité sur différents micro-organismes			Persistance du résiduel
	Bactéries	Virus	Protozoaire ^a	
Chlore libre				
Sous forme d'acide hypochloreux	++++	++++	++	Bonne
Sous forme d'ion hypochlorite	+++	++		
Dioxyde de chlore	++++	++++		Convenable
Chloramines (mono-, di- et trichloramines)	++	+	+	Excellente
++++ activité biocide excellente, +++ activité biocide bonne, ++ activité biocide modérée, + activité biocide faible				

^a forme kystique

5.3. REPONSE CELLULAIRE DES MICRO-ORGANISMES AUX BIOCIDES

Les bactéries sont capables de développer des mécanismes de résistance et d'adaptation aux stress chimiques générés par les biocides (Figure 1-31). Ces mécanismes peuvent aboutir à la fois à des phénomènes de résistance et de tolérance.

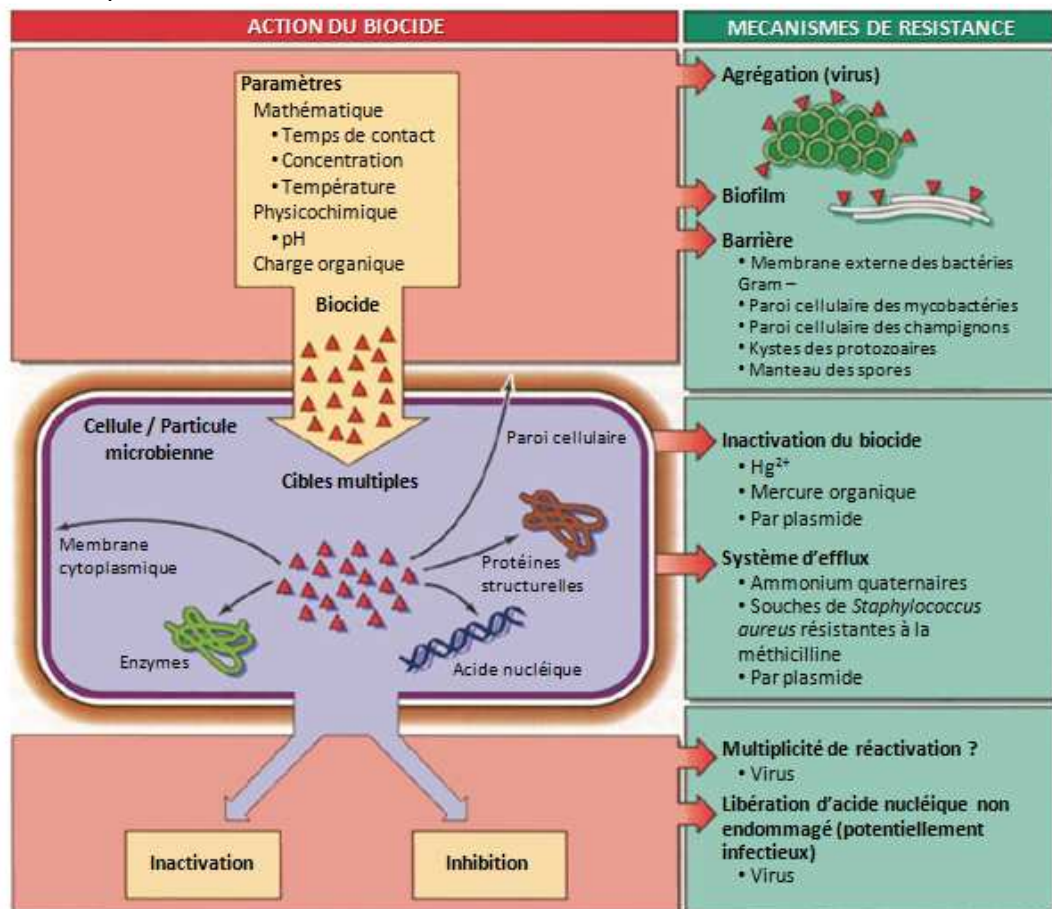


Figure 1-31: Schéma général des différents mécanismes de lutte des bactéries contre les agents antibactériens (d'après Doyle *et al.*, 2006).

Les résistances aux biocides sont beaucoup moins étudiées que les résistances aux antibiotiques, pourtant les « stratégies » de résistances sont les mêmes : inactivation de l'inhibiteur, altération du site cible, exclusion du site cible... Il reste difficile de corréler les résistances observées aux expérimentations *in vitro* réalisées dans des conditions éloignées des conditions naturelles (Maillard, 2007).

Il existe quatre types de mécanismes de résistance décrits dans la littérature :

- mécanismes intrinsèques ou innés
- mécanismes acquis
- mécanismes d'adaptation phénotypique
- mécanismes environnementaux.

5.3.1. RESISTANCE BACTERIENNE INNEE

Ce type de résistance provient d'une capacité naturelle de certaines bactéries à résister à un biocide (Russell, 1995; Maillard, 2007). Une résistance innée signifie que chaque membre d'une même espèce est résistant sans aucune altération génétique. Cette résistance est due à différentes propriétés cellulaires des bactéries qui se retrouvent notamment chez les bactéries à Gram négatif, les spores ou les mycobactéries. Russell (1997) propose une classification des micro-organismes en fonction de leur sensibilité aux biocides (Figure 1-32). Cette classification a été confirmée par plusieurs études (Maillard, 2002; Arnitz *et al.*, 2009; Tumah, 2009)

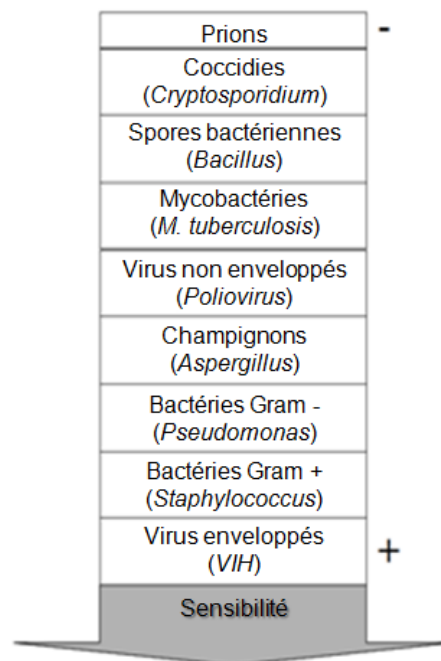


Figure 1-32: Classification des micro-organismes selon leur sensibilité aux biocides : du moins sensible (-) au plus sensible (+) (d'après Tumah, 2009).

Les sources de la résistance innée chez les micro-organismes sont de deux types :

- Les barrières à la pénétration du biocide (*Annexe IX : Les barrières à la pénétration du biocide*) : selon la nature et la composition de la membrane cellulaire, le taux de biocide pénétrant dans la cellule est plus ou moins important :
 - ➔ Les spores bactériennes de *Bacillus* sp. ou *Clostridium* sp. sont invariablement les plus résistantes aux biocides de toutes les bactéries. Les multiples membranes internes et externes des spores bactériennes limitent la pénétration des agents biocides (Russell, 1995; Tumah, 2009).
 - ➔ La résistance des mycobactéries est considérée comme intermédiaire entre les spores bactériennes et les bactéries non-sporulentes. Leur résistance est liée à la structure de leur membrane qui limite l'incorporation des biocides : il s'agit d'un squelette constitué de deux polymères liés covalamment, et de la présence de lipides libres et de peptides (Lambert, 2002; Fraud *et al.*, 2003; Tumah, 2009).
 - ➔ Les bactéries à Gram négatif sont généralement moins sensibles aux biocides que les bactéries à Gram positif. La membrane des bactéries à Gram négatif fonctionne comme une barrière imperméable aux biocides (Brown, 1975; Tumah, 2009). Le rôle primordial de la structure spécifique des composants membranaires comme les lipopolysaccharides (impliqués dans l'hydrophobicité des membranes des bactéries) et les peptidoglycanes (impliqués dans l'imperméabilité des membranes en liant les membranes externes et internes) dans les mécanismes de résistance a été démontré (Burman, 1972; Russell *et al.*, 1987; Russell, 1995; Denyer, 2002). Par ces mécanismes, *Pseudomonas aeruginosa* possède une membrane bactérienne particulièrement imperméable aux biocides (Bruinsma *et al.*, 2006). De même, les porines, protéines membranaires des bactéries à Gram négatif, constituent des canaux permettant les échanges moléculaires de la bactérie avec le milieu extérieur. Les bactéries résistantes réduisent le nombre ou la taille des porines, limitant ainsi la diffusion des biocides (Achouak, 2001; Denyer, 2002; Tumah, 2009).
- La diminution de l'accumulation du biocide : par les systèmes d'efflux (rejet du biocide à l'extérieur de la cellule par des pompes à efflux - *Annexe X : Résistance bactérienne par systèmes d'efflux*) ou des systèmes de dégradation intracellulaire du biocide (synthèse d'enzymes modifiant la structure chimique du biocide - *Annexe XI : Résistance bactérienne par inactivation du biocide*) (Nishihara *et al.*, 2000; Poole, 2005; Maillard, 2007), certaines bactéries comme *Pseudomonas fluorescens* peuvent être résistantes à l'agent antimicrobien.

Ces deux mécanismes de diminution de l'accumulation peuvent être des mécanismes de résistance innée ou peuvent être le résultat d'une acquisition de gènes de résistance exogènes.

Les légionelles possèdent une certaine résistance innée aux biocides due à la composition de leur membrane (bactérie à Gram négatif). Elles sont donc moins sensibles que les bactéries à Gram positif. *Legionella* spp. possède une membrane riche en phosphatidylcholine, lipide hydrophobe qui participe à la résistance innée de ce genre bactérien aux biocides chlorés.

5.3.2. RESISTANCE BACTERIENNE ACQUISE

Les résistances acquises sont des phénomènes de variation génétique ou d'adaptation aux stress environnementaux. En conditions de stress, la perte de sensibilité d'une bactérie à un biocide peut être liée à :

- L'acquisition d'un élément extra-chromosomique (plasmide ou transposon) qui code pour la synthèse d'une enzyme dégradant le biocide ou pour un système d'efflux rejetant le biocide à l'extérieur par pompage actif. Ce phénomène largement décrit pour les résistances bactériennes aux antibiotiques est responsable de peu de résistance aux biocides (mécanisme de résistance aux ions argent, au mercure et au formaldéhyde). Le phénomène de résistance acquise par plasmides ou transposon opère préférentiellement chez les bactéries à Gram positif (chez les bactéries à Gram négatif, les mécanismes d'efflux ou de dégradation du biocide sont portés par l'ADN chromosomique) (Paulsen *et al.*, 1993; Poole, 2005). Certaines bactéries ayant développé des résistances aux antibiotiques par plasmides, développent également des résistances aux biocides (et inversement). Ce phénomène de « multi-résistance » est lié notamment aux modifications membranaires conférées par le plasmide. Ainsi *Staphylococcus aureus* portant le plasmide de résistance à la gentamicine montre une faible sensibilité à certains biocides : ammonium quaternaire, chlorehexidine, bromure d'éthidium, acridine, diamines.
- La mutation génétique de la cible du biocide. Ce phénomène de résistance est également décrit pour les résistances aux antibiotiques. Seules des résistances par mutation de cibles génétiques au biocide Triclosan ont été décrites, chez *Mycobacterium smegmatis* par exemple (McMurry *et al.*, 1999). Ce type de résistance aux biocides est un phénomène rare puisque les biocides chimiques n'ont pas de cibles cellulaires spécifiques et s'attaquent à tous les composés de la cellule (Heath et Rock, 2000). Cependant, des résistances aux biocides par mutation peuvent être induites chez les bactéries en les faisant croître sur des concentrations croissantes de biocide, mais ces mutations ne sont pas toujours stables (Russell, 2001).

Il n'existe aujourd'hui aucun élément décrit de résistance acquise (ni par acquisition de plasmide ou de transposon, ni par mutation génétique) des légionelles aux biocides chlorés. Il semble que certaines souches de légionelles aient développé suite au traitement biocide des tolérances mais ce phénomène n'a pas été démontré (Casini *et al.*, 2008a). Le réseau de distribution d'eau d'un hôpital situé en Italie a fait l'objet d'une surveillance de l'efficacité du traitement anti-légionelles au dioxyde de chlore pendant cinq ans. Les auteurs ont pu montrer qu'une souche tolérante au biocide, non détectée avant le traitement, persiste trois ans après l'arrêt du traitement. Ils ont émis l'hypothèse d'une possible apparition de tolérance suite à l'utilisation en continu du biocide. Des plasmides ont été isolés des légionelles mais leur rôle dans la résistance aux biocides n'est pas défini (Knudson et Mikesell, 1980). Les *L. pneumophila* environnementales peuvent posséder un plasmide transférable (uniquement entre bactéries *L. pneumophila*) conférant une résistance aux rayonnements UV et favorisant la prolifération dans l'environnement (Tully, 1991).

5.3.3. RESISTANCE BACTERIENNE PAR ADAPTATION PHENOTYPIQUE

Ce type de résistance consiste en un profil d'expression génétique particulier lorsque les micro-organismes sont soumis à un stress. Cinq types de réponses au stress peuvent être exprimés :

- Réponse SOS. Cette réponse est induite par les agents endommageant l'ADN. Le nombre de mécanismes d'action de réparation SOS est variable en fonction des espèces bactériennes. Chez *Bacillus subtilis* on dénombre quatre systèmes différents contre un seul chez *Escherichia coli*. La résistance bactérienne est finement liée aux mécanismes de réparation SOS de l'ADN (Foster, 2005, 2007).
- Réponse générale au stress. La réponse générale est induite par des stress variés : carences nutritionnelles, réduction du taux de croissance, pression osmotique élevée, pH bas, delta extrême de température. Un facteur est alors activé et redirige l'ARN polymérase vers plusieurs centaines de gènes, dont certains sont impliqués dans des mécanismes de résistance à des stress multiples. Ce mécanisme permet à la bactérie de lutter contre le stress inducteur, mais aussi la prépare à affronter d'autres stress potentiels, notamment en périodes de carence prolongée. On considère ainsi que ce type de réponse, décrit chez la plupart des bactéries étudiées, joue un rôle essentiel pour leur survie dans la nature (Weber *et al.*, 2005).
- Réponse aux chocs thermiques. La réponse au choc thermique est un mécanisme de protection cellulaire essentiel contre différents stress : la chaleur mais également les dommages à l'ADN, le stress oxydant, les antibiotiques, les ions métalliques, le manque de carbone et d'acides aminés (Foster, 2007). En réponse à ces stress, les bactéries synthétisent des protéines de stress agissant comme des protéines chaperonnes qui réparent ou dégradent des protéines endommagées par l'action du biocide (Layton et Foster, 2005).
- Réponse stringente. Il s'agit de mécanismes de transformation phénotypique par ajustement de l'expression génique qui privilégie la survie plutôt que la croissance du micro-organisme en cas d'environnement nutritif pauvre (Traxler *et al.*, 2008).
- Réponse spécifique au stress oxydant. Il s'agit d'un mécanisme d'activation d'un ensemble de gènes organisés en régulons (régulons oxyR-oxyS et soxR-soxS) qui aboutit à la synthèse de protéines spécifiques (dont les protéines de la réponse SOS, de la réponse aux chocs thermiques) (Dukan et Touati, 1996; Wang *et al.*, 2009).
- Réponse VBNC (Bactérie Viable Non cultivable). En condition de stress (manque de nutriment, incubation hors température optimale de croissance, variations des concentrations osmotiques ou de la concentration en oxygène, exposition à la lumière...), la bactérie rentre dans un état de dormance, son métabolisme est actif mais la division cellulaire est inhibée, c'est l'état VBNC (Oliver *et al.*, 2005). Cet état est temporaire, le caractère cultivable réapparaît lorsque les conditions sont favorables. L'état VBNC est donc un état distinct qui est mis en place en réponse à différents stress environnementaux où les bactéries adoptent un profil protéique particulier (Heim *et al.*, 2002).

Les légionelles peuvent développer des mécanismes d'adaptation phénotypique de plusieurs types :

- Réponse au stress oxydant : activation transitoire d'un système de défense avec répression de 52 gènes et surexpression de neuf gènes (dont les gènes du stress oxydant, de la réponse SOS et du choc thermique) qui aboutissent à la surproduction

de différentes protéines notamment la protéine hsp60 (*heat shock protein 60*). Cependant, aucun lien clair n'a été mis en évidence entre la synthèse de cette protéine et une résistance aux biocides chlorés (Abu Kwaik, 1993; Sadosky *et al.*, 1994; Abu Kwaik *et al.*, 1997; Bandyopadhyay et Steinman, 1998, 2000; LeBlanc *et al.*, 2008).

- Adaptation phénotypiques : des conditions de croissance défavorables (carences nutritionnelles, variation de pH...) induisent chez les légionelles des adaptations phénotypiques (réponse générale au stress, réponse stringente) permettant une tolérance au chlore (Kuchta *et al.*, 1985; Chang, 2007). La tolérance aux biocides ayant un coût énergétique fort pour les bactéries, cette tolérance est perdue lorsque la pression de sélection n'est pas maintenue (une étape de culture du micro-organisme sur un milieu riche implique la perte du phénotype tolérant) (Kuchta *et al.*, 1985; Maillard, 2007).
- Etat viable mais non cultivable (VBNC) : bien que l'efficacité des biocides sur la réduction et l'inactivation des légionelles cultivables ne soit plus à démontrer (Kuchta *et al.*, 1983; Muraca *et al.*, 1987; Cunliffe, 1990; Green et Pirrie, 1993; Kool *et al.*, 1999a; Flannery *et al.*, 2006), les légionelles peuvent entrer dans un état viable mais non cultivable lorsqu'elles sont soumises à un biocide (Bej *et al.*, 1991; Oliver *et al.*, 2005; Alleron *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009). Cet état peut persister pendant de longues périodes jusqu'à l'apparition de conditions propices à leur développement ou après co-culture avec des amibes (Garcia *et al.*, 2007; Dusserre *et al.*, 2008).

5.3.4. MECANISMES DE RESISTANCES ENVIRONNEMENTALES

Les résistances environnementales sont des stratégies de survie des bactéries en milieu hostile. Elles sont considérées comme capables de moduler la résistance intrinsèque d'une bactérie. Elles peuvent être de deux types : le développement dans les biofilms (résistance par biofilm) ou l'endosymbiose avec des amibes ou des protozoaires ciliés (Maillard, 2007).

5.3.4.1. LE DEVELOPPEMENT DANS LES BIOFILMS

Le biofilm, de part sa structure, offre une protection des bactéries aux biocides par la diffusion limitée du biocide dans le biofilm (Shirliff *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

Les bactéries sessiles présentent un phénotype différent des bactéries planctoniques appelé «phénotype biofilm» (LeChevallier *et al.*, 1988). Ce phénotype particulier conduit à la modification des propriétés intrinsèques des bactéries (Russell, 1995) avec une expression génique particulière qui conduit à des états de sensibilité différents. Dans le biofilm, les légionelles ont un profil d'expression particulier avec notamment la surexpression d'une enzyme impliquée dans la réponse aux stress oxydant (alkyl hydroperoxyde reductase) (Hindre *et al.*, 2008). Le développement dans les biofilms confère donc aux bactéries une tolérance au biocide plus importante due à deux phénomènes distincts : la protection physique et la modification phénotypique. Ainsi, la forme sessile de *L. pneumophila* résiste à une injection de chlore à une concentration de 200 mg/L alors que la forme planctonique est sensible à une injection de chlore dont la concentration est supérieure à 0.5 mg/L (Cooper et Hanlon, 2010). Le traitement biocide est donc efficace contre les légionelles planctoniques mais leur efficacité est réduite lorsque les légionelles sont dans le biofilm. La monochloramine, avec sa meilleure pénétration dans le biofilm (Samrakandi *et al.*, 1997;

Kool *et al.*, 1999a; Taretgen, 2004; Lee *et al.*, 2011), a une efficacité plus grande sur les légionelles sessiles que les autres types de biocides chlorés (LeChevallier *et al.*, 1988). Les mécanismes impliqués dans ces résistances bactériennes en biofilm sont complexes, la résistance par le biofilm implique l'utilisation d'un dosage supérieur de biocide pour éradiquer les bactéries vis-à-vis du dosage déterminé par des tests sur cellules planctoniques (Ozlem Sanli-Yurudu *et al.*, 2007).

5.3.4.2. L'ENDOSYMBIOSE DES BACTERIES AVEC LES AMIBES ET LES PROTOZOAIRE CILIES

La présence d'amibe et de protozoaires dans un système d'eau peut favoriser la multiplication et le transport de bactéries (Bichai *et al.*, 2008). Trois cas de figures peuvent être observés : (i) les bactéries se multiplient dans leur cellule hôte et causent leur lyse cellulaire, (ii) les bactéries se multiplient sans causer la mort cellulaire de l'hôte, (iii) les bactéries survivent mais ne se multiplient pas. ces organismes lorsque colonisés par des bactéries offrent une protection significative contre les biocides, favorisent leur transport, leur multiplication et leur virulence (Kuchta *et al.*, 1993). Les amibes et les protozoaires ciliés induisent également des adaptations phénotypiques conduisant à une tolérance des bactéries aux attaques biocides ultérieures (Barker *et al.*, 1992; Barker *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2009). Ainsi, l'endosymbiose de *Legionella* sp. avec une amibe ou la présence conjointe des légionelles et des amibes dans les biofilms augmente la résistance des légionelles au traitement thermique et aux biocides (Kilvington et Price, 1990; Barker *et al.*, 1992; Donlan *et al.*, 2005). Par exemple, l'endosymbiose de *Legionella* sp. avec un kyste d'*Acanthamoeba polyphaga* permet à la bactérie de survivre en présence de 50 mg/L chlore libre (King *et al.*, 1988).

Le degré de tolérance des légionelles après le développement dans les amibes dépend de l'espèce hôte : les bactéries développées au sein de l'amibe *Hartmannella vermiformis* ont une tolérance au chlore supérieure aux légionelles développées chez *Acanthamoeba castellanii*, hôte de prédilection de la légionelle. Cette différence de résistance serait liée aux conditions de développement moins favorables chez l'amibe *Hartmannella vermiformis* (que chez *Acanthamoeba castellanii*) à l'origine d'une adaptation phénotypique de la bactérie au stress intracellulaire (Chang *et al.*, 2009). Ces adaptations prépareraient également la bactérie à des stress ultérieurs, (notamment le stress induit par les biocides chlorés) par la synthèse de protéines spécifiques permettant la protection de la bactérie de l'attaque par le chlore (Chang, 2007), la modification de la composition lipidique de la membrane (Barker *et al.*, 1993) et de son épaissement limitant l'incorporation du chlore dans la membrane et dans le cytoplasme (Chang, 2007). Thomas *et al.* (2004) émettent l'hypothèse que dans le biofilm, les amibes agissent probablement en tant que réservoirs pour *L. pneumophila* et permettent une recolonisation du système lorsque les traitements sont interrompus. Pour être actifs sur les bactéries ingérées, les traitements biocides doivent être appliqués à la dose active sur les amibes (Thomas *et al.*, 2004).

5.4. REPONSE ECOSYSTEMIQUE AUX BIOCIDES

L'application d'un biocide dans un système aquatique artificiel impacte l'ensemble de la flore du réseau. Face à une perturbation physico-chimique de l'environnement, une communauté microbienne peut répondre de quatre manières différentes (Figure 1-33) (Allison et Martiny, 2008) :

- la résistance de la communauté : la composition de la communauté microbienne ne change pas face à la perturbation ;
- la résilience de la communauté : la perturbation de l'environnement entraîne un changement dans la composition de la communauté mais ce changement est temporaire, la communauté retourne à sa composition initiale ;
- la redondance fonctionnelle de la communauté : la perturbation de l'environnement entraîne une modification durable de la composition de la communauté mais la fonction de celle-ci dans l'écosystème ne change pas et est assurée par d'autres groupes bactériens ;
- la perturbation durable de la communauté : la modification physico-chimique de l'environnement entraîne une modification de la composition et de la fonction de la communauté dans l'écosystème.

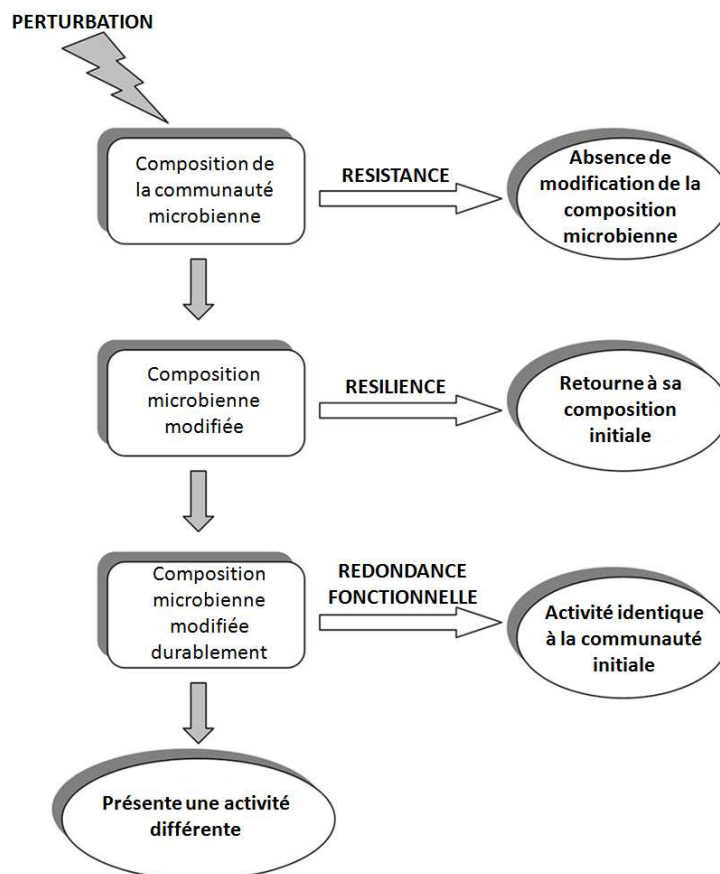


Figure 1-33: Représentation schématique des différentes réponses d'une communauté microbienne et de leurs conséquences fonctionnelles face à une perturbation environnementale (d'après Allison et Martiny, 2008).

Peu d'études ont mis en regard les réponses compositionnelles et fonctionnelles des écosystèmes aquatiques aux perturbations environnementales. Dans les systèmes aquatiques artificiels, une perturbation environnementale telle que celle provoquée par l'utilisation de biocide, entraîne une réduction globale des taux de colonisation (cultivable et viable mais non cultivable), en phase planctonique et sessile, ainsi qu'une baisse de la diversité bactérienne (Ridgway et Olson, 1982; Norton et LeChevallier, 2000; Eichler *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2009; Kormas *et al.*, 2010; Poitelon *et al.*, 2010). Cette baisse de la diversité s'accompagne, en fonction du biocide utilisé, d'un changement dans la dominance bactérienne (Kormas *et al.*, 2010). En présence de chlore, Norton et LeChevallier (2000) ont montré qu'une forte proportion de bactéries à Gram positif s'installe dans la phase planctonique alors que le biofilm présente une majorité de bactéries à Gram négatif. Cette différence de dominance entre la phase fixée et circulante semble être fonction des différences de capacité d'adhésion des cellules au biofilm (Murgel *et al.*, 1991). Dans le biofilm, le chlore entraîne une modification de la proportion des protéobactéries. Sur des biofilms artificiels représentatifs de biofilms de réseau de distribution d'eau potable, des essais de chloration ont montré que le chlore, en plus de diminuer efficacement la flore du biofilm, entraîne une modification dans la composition de la communauté microbienne (Batté *et al.*, 2003). La vitesse d'abattement des différents groupes bactériens par le chlore diffère, ce qui a pour conséquence un changement dans les proportions entre les groupes bactériens. Trois jours après le début du traitement au chlore, la proportion des protéobactéries (α -, β -, γ -) diminue pour représenter moins de 25% des bactéries totales. Sept jours après le début du traitement, la tendance initiale s'inverse, la proportion des protéobactéries a augmenté pour représenter plus de 85% des bactéries totales. Une autre étude a montré que parmi les protéobactéries, la classe des α -*Proteobacteria* prédomine en absence de chlore libre. En présence de chlore, la proportion de la classe α - diminue alors que celles des classes β - et γ - augmentent (Mathieu *et al.*, 2009).

Mathieu *et al.* (2009) montrent, en pilote, les capacités de résilience des communautés bactériennes de biofilm de système de distribution d'eau potable face à un traitement discontinu au chlore. Les biofilms étudiés ont été soumis à des traitements successifs au chlore à différentes concentrations (0.1 mg Cl_2/L pendant 4.5 mois puis 0.4 mg Cl_2/L pendant deux mois et enfin, 0.1 mg Cl_2/L pendant 2.5 mois ; ou 0.4 mg Cl_2/L pendant cinq mois puis 0.1 mg Cl_2/L pendant deux mois et enfin, 0.4 mg Cl_2/L pendant trois mois). Les proportions entre les différentes classes appartenant aux *Proteobacteria* ont été mesurées par la méthode FISH. Cette étude montre que les proportions en α - et γ -*Proteobacteria* observées au 3^{ème} cycle de traitement par le chlore, quelques semaines après le début de l'expérience, sont identiques à celles observées au 1^{er} cycle. La classe des β -*Proteobacteria* ne présente pas systématiquement le même comportement. Il semble que ce groupe bactérien soit favorisé par des fortes concentrations en chlore. Suite aux observations des dynamiques des α - et γ -*Proteobacteria*, les auteurs concluent que ces communautés de protéobactéries dans les écosystèmes aquatiques semblent être capables de résilience bactérienne. La modification de l'écosystème bactérien induit par le traitement au chlore pourrait donc être réversible.

Le traitement par la monochloramine n'a pas le même effet que le chlore sur les communautés microbiennes. Alors que les différentes classes de protéobactéries d'un biofilm représentatif d'un système de distribution d'eau potable, ne sont pas affectées de la même manière par le chlore, la monochloramine conduit à une réduction générale de la

proportion des bactéries appartenant aux classes α -, β - et γ -*Proteobacteria*, au profit d'autres groupes bactériens non identifiés (Batté *et al.*, 2003). Ce résultat souligne le fait que le chlore et la monochloramine ne possèdent pas les mêmes cibles cellulaires. Les cellules bactériennes répondent différemment au stress généré par ces deux biocides. Les vitesses d'abatement par les biocides dépendent donc, à la fois du biocide utilisé et du groupe taxonomique ciblé. Les différents mécanismes d'inactivation des cellules par les biocides entraînent une réaction différente des communautés microbiennes au sein du biofilm.

Concernant les populations de légionelles, Pryor *et al.* (2004) ont conduit une étude sur des biofilms issus d'un réseau de distribution d'eau potable lors d'une modification du processus de traitement (passage d'un processus de désinfection au chlore libre vers l'utilisation de la monochloramine). Les auteurs montrent que ce changement de biocide induit une modification significative de la composition microbienne du biofilm avec la disparition de certains groupes bactériens prédominants et l'apparition d'autres groupes bactériens minoritaires sous l'influence du chlore. Lors de la phase de traitement au chlore, les bactéries appartenant au genre *Sphingomonas*, *Pseudomonas* deviennent dominantes et l'ensemble des bactéries hétérotrophes voient leur proportion augmenter. Les légionelles, qui représentaient 20% de la communauté microbienne du biofilm lorsque le système était traité au chlore, ne représentent que 6% de la communauté lors du traitement à la monochloramine. La diversité des légionelles est également affectée par ce changement de mode de désinfection. Huit espèces de légionelles ont été détectées lors de la phase de traitement au chlore alors que seulement trois espèces ont été détectées sous l'influence de la monochloramine. La proportion et la diversité de l'ensemble des légionelles sont affectées par le changement de traitement. Cependant, les populations de légionelles appartenant à l'espèce *L. pneumophila* ne semblent pas être affectées par le changement de désinfectant. Les concentrations en *L. pneumophila*, relevées à la fois par PCR et par culture, ne sont pas modifiées par le changement de biocide.

5.5. CONCLUSIONS

Le chlore et ses dérivés sont des biocides oxydants dont l'activité antimicrobienne résulte de l'oxydation des composés extra et intracellulaires. Le stress oxydant généré agit en perturbant les structures cellulaires et les processus métaboliques protéiques, lipidiques, nucléotidiques. Selon la nature de l'oxydant et particulièrement de son état d'oxydation, les dommages prépondérants sont extracellulaires (ozone), intracellulaires (chlore libre) ou intermédiaires (dioxyde de chlore).

Pour les biocides chlorés, la perte de sensibilité n'apparaît pas comme une résistance génétiquement acquise mais plutôt comme une combinaison de résistance environnementale (présence de biofilm et développement intra-amibien) et d'adaptation phénotypique. Les processus d'adaptation phénotypiques ou tolérance ne sont ni héréditaires, ni transférables, ni maintenus hors pression de sélection. C'est un changement transitoire de sensibilité causé par des facteurs environnementaux comme le biofilm, le développement intra-amibien, le mode de croissance....

Le biofilm et les amibes peuvent constituer des réservoirs de légionelles et les préparent à d'éventuels stress oxydants ultérieurs. Ces adaptations restent transitoires, le retour à des conditions favorables entraîne la perte de la tolérance aux biocides. De plus, les bactéries tolérantes restent sensibles à des concentrations élevées en biocides.

Les biocides impactent l'ensemble de la flore du réseau. Les réactions de l'écosystème en réponse au stress généré par les traitements dépendent du type de biocide utilisé. Il semble que certaines populations naturellement présentes dans la communauté microbienne aient des capacités de résilience face aux biocides chlorés. La perturbation de ces communautés semble être transitoire.

CHAPITRE 2 :

ÉCOLOGIE DES LEGIONELLES DANS

L'EAU DES CIRCUITS DE

REFROIDISSEMENT DES CENTRALES

NUCLEAIRES EN BORD DE LOIRE



INTRODUCTION

La synthèse bibliographique met en évidence que les légionelles, bactéries ubiquitaires des environnements aquatiques, peuvent survivre et se développer dans des conditions physico-chimiques très variées. Les systèmes aquatiques artificiels semblent constituer pour ce genre bactérien des niches écologiques favorables à leur développement et à leur maintien. L'inhalation possible d'aérosols générés par certaines installations, et contaminés par des légionelles peut provoquer la légionellose et crée, pour les populations environnantes, un risque sanitaire. Pour comprendre et lutter contre la présence de ces populations dans les systèmes artificiels, de nombreuses études ont été menées. L'ensemble de ces études suggèrent qu'il existe une écologie complexe des légionelles dans ces systèmes. En effet, la grande variabilité des situations dans lesquelles ces bactéries ont été détectées, l'absence de paramètres prédictifs de leur présence et de leur développement, les relations étroites que ce genre bactérien entretient avec la flore environnante indiquent que les mécanismes aboutissant à leur présence et à leur développement dans les systèmes artificiels sont multiparamétriques et que les légionelles sont douées d'une grande plasticité. En présence de biocide, les légionelles peuvent adopter des mécanismes de lutte contre l'attaque de l'agent chimique. Qu'ils soient phénotypiques ou environnementaux, ces mécanismes de lutte permettent aux légionelles de persister pendant de longues périodes dans les installations traitées et de recoloniser les circuits une fois le traitement arrêté. La recolonisation des CRF peut également avoir pour origine l'apport de légionelles par l'eau d'appoint provenant de la rivière. Les résultats de l'ensemble de ces études suggèrent que les modalités d'interactions des légionelles avec leur environnement biotique et abiotique sont dépendantes des espèces voire des souches de légionelles.

1. CONTEXTE INDUSTRIEL

Les circuits de refroidissement des centrales nucléaires en bord de rivière sont concernés par la problématique sanitaire liée à la présence de légionelles dans ces installations. En effet, bien qu'ultra minoritaire par rapport à l'ensemble des autres populations microbiennes présentes dans ces circuits, le développement de ces bactéries, compte-tenu de leur pathogénicité, constituent un risque sanitaire pour les travailleurs et les populations environnantes en cas de transfert à l'atmosphère via les tours aéroréfrigérantes. Consciente de cette problématique, EDF a engagé un certain nombre d'actions de suivis sur les circuits incriminés, d'amélioration des connaissances sur les facteurs de développement de ces populations ainsi que sur la survie des légionelles aérosolisées.

Sur le plan réglementaire, le risque de légionellose est un problème de santé publique identifié comme étroitement lié aux systèmes susceptibles de générer des aérosols contaminés. Pour lutter contre la prolifération des germes pathogènes dans les CRF et respecter les seuils de concentration en légionelles à ne pas dépasser, des traitements physiques ou chimiques peuvent être employés. Actuellement seul le CNPE de Chinon comporte depuis 2005 un traitement à visée anti-légionelles de ses circuits pour limiter les proliférations de ces populations. Dans ce cas précis, il s'agit d'un traitement chimique par injection en continu dans le circuit de monochloramine préformée. Six autres CNPE sont également traités en période estivale pour limiter la prolifération d'un autre germe pathogène, l'amibe libre *Naegleria fowleri*. Ces circuits constituent en cela des lieux

d'observation du comportement des légionelles face au traitement appliqué (qu'il soit à visée anti-légionelles ou anti-amibes) en grandeur réelle. Le retour d'expérience, bien que limité, montre déjà que le traitement mis en place permet de réduire significativement les concentrations en légionelles en deçà du seuil réglementaire. Mais, parmi les échanges entre l'administration et EDF, une question récurrente se pose quant à l'éventuelle apparition d'une résistance des légionelles au traitement à la monochloramine.

Les suivis actuels réalisés sur les circuits de refroidissement permettent de connaître les concentrations en *Legionella* totales et en *L. pneumophila* par des méthodes culturales complétées par l'identification phénotypique des populations majoritaires par une approche immunologique. Cette information, suffisante pour l'exploitant, ne permet pas l'étude des phénomènes de prolifération de ces micro-organismes dans leur environnement car elle n'est pas adaptée à un suivi plus approfondi des variations spatio-temporelles des populations de légionelles. Pour améliorer notre compréhension des mécanismes de développement et de survie des légionelles dans les CRF des CNPE en bord de rivière, qu'ils soient traités ou non, il apparaît nécessaire d'établir la diversité des sous-populations de légionelles et de suivre leur dynamique spatiale et temporelle, en lien avec l'évolution de leurs concentrations.

2. OBJECTIFS

L'étude écologique des légionelles dans les CRF des CNPE en bord de Loire a pour objectif principal d'établir leur diversité et leur dynamique en lien avec l'évolution de leurs concentrations dans les CRF et de déterminer l'effet de la monochloramine sur ces populations dans l'objectif de mieux caractériser les phénomènes de persistance et de recolonisation observés dans les CRF.

Cette étude doit permettre :

- d'établir la diversité et la dynamique spatio-temporelle des sous-populations de légionelles et notamment de l'espèce *L. pneumophila* dans les CRF ;
- d'identifier l'influence de facteurs abiotiques et biotiques sur la diversité et la dynamique de ces sous-populations ;
- de rechercher des éléments de corrélations entre diversité et dynamique des sous-populations de *L. pneumophila* permettant éventuellement de déterminer des souches responsables des remontées de concentration dans les CRF ;
- de suivre plus finement les CRF traités à la monochloramine afin d'identifier des souches potentiellement tolérantes au biocide et responsables des recolonisations des CRF après l'arrêt des traitements ;
- de déterminer, en laboratoire, la sensibilité des souches de *L. pneumophila* à la monochloramine afin de statuer sur une éventuelle résistance des souches au biocide.

Pour répondre à ces objectifs, différentes méthodes de travail ont dû être développées et validées.

3. SITES D'ETUDES

Le contexte réglementaire particulier des centrales nucléaires d'EDF permet de réaliser des suivis de populations microbiennes en grandeur réelle sur circuits, en l'absence ou en présence de traitement suivant la période et les sites. Cette situation présente l'avantage de pouvoir caractériser les populations naturellement présentes dans les CRF, leur diversité et leur dynamique ainsi que leurs interactions avec les autres populations présentes, que ce soit à l'échelle du CRF mais aussi à l'échelle d'une rivière et de son bassin par un suivi parallèle sur plusieurs sites. La Loire, avec ses 12 tranches nucléaires, est le cours d'eau présentant le plus grand nombre de sites nucléaires en France. Ce bassin avec quatre CNPE basés sur ce cours d'eau (*Annexe XII : Les quatre CNPE localisés sur la Loire*), présentant des conceptions (nature des condenseurs, conception des TAR) et des processus d'exploitations différents (deux CNPE non traités, deux CNPE traités en continu à la monochloramine, l'un traité toute l'année et l'autre traité pendant la période estivale), représente un site d'étude idéal pour le suivi de la diversité et de la dynamique des sous-populations de légionelles dans les CRF des CNPE bord de rivière. Les circuits de refroidissement des centrales nucléaires sont considérés comme les plus importants circuits de refroidissement industriels de part leur volume et leur débit d'eau. Aucune étude portant sur l'écologie des légionelles dans ce type de circuit n'a été, à ce jour, publiée. De plus, la littérature ne rapporte pas de suivi simultanée sur plusieurs circuits sur une même rivière des populations de légionelles. Ce travail constituera donc une première étude permettant d'évaluer l'impact local (circuit) et global (rivière) sur l'évolution des populations des légionelles.

4. METHODOLOGIE

Pour l'étude de la diversité et de la dynamique des légionelles, un échantillonnage massif et régulier de l'eau des CRF des quatre CNPE en bord de Loire a été réalisé pendant une année, à raison d'un prélèvement par mois dans chacun des circuits. Une méthode de typage par biologie moléculaire des sous-populations de légionelles, isolées par des méthodes culturales, permet d'établir la diversité des légionelles, de lier leur dynamique spatio-temporelle à l'évolution de leur concentration et de mesurer l'impact du traitement à la monochloramine sur les communautés de légionelles. Différentes analyses physico-chimiques et microbiologiques de l'eau ont été réalisées dans l'objectif d'évaluer l'influence de paramètres abiotiques et biotiques sur ces communautés.

Pour l'étude de la sensibilité des souches de légionelles à la monochloramine, la méthodologie adoptée a été de développer une méthode de détermination en laboratoire de la sensibilité des souches de légionelles à la monochloramine, puis de réaliser les tests *in vitro* sur un jeu de souches sélectionnées selon plusieurs critères.

ARTICLE 1:

**VALIDATION OF IRS PCR, A MOLECULAR TYPING METHOD,
FOR THE STUDY OF THE DIVERSITY AND POPULATION
DYNAMICS OF *LEGIONELLA* IN INDUSTRIAL COOLING CIRCUITS**

**Delphine Jakubek, Matthieu Le Brun, Gérard Leblon, Michael
DuBow, Marie Binet**

Letters in Applied Microbiology, DOI: 10.1111/lam12025

PRESENTATION DU TRAVAIL

L'étude de la communauté de légionelles présentes dans l'eau des circuits de refroidissement des centrales nucléaires nécessite une méthode de typage permettant de caractériser leur diversité et leur dynamique spatio-temporelle et de confronter ces résultats avec leurs concentrations en CRF, mesurées par la méthode préconisée pour le suivi réglementaire, c'est à dire par la méthode normalisée de dénombrement par culture.

Bien que l'analyse de la bibliographie suggère que les méthodes les plus appropriées pour réaliser des suivis écologiques sont des méthodes d'identification des micro-organismes sans étape de culture préalable, l'étude des communautés de légionelles cultivables est plus adaptée à l'objectif de notre étude. En effet, au regard de la réglementation, seule la fraction de légionelles cultivables est d'intérêt sanitaire. Il a donc été choisi, dans un premier temps, de ne travailler que sur la fraction cultivable des légionelles. De plus, des études réalisées en interne, ont montré que les caractéristiques de l'eau des circuits de refroidissement (forte teneur en matières organiques, présence d'inhibiteur de PCR) ne sont pas propices à la réalisation d'étude microbiologique sans culture, et nécessiteraient des développements particuliers et fastidieux pour l'extraction et l'amplification de l'ADN.

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE

La méthode utilisée pour le suivi écologique des populations de légionelles cultivables dans les CRF doit présenter une résolution taxonomique inférieure à l'espèce et doit également avoir un fort pouvoir discriminant ainsi qu'une bonne reproductibilité. La méthode doit également être adaptée aux contraintes expérimentales d'un suivi écologique : typage d'un nombre important d'isolats, rythme régulier des prélèvements avec un pas de temps court. La méthode doit donc présenter des avantages de rapidité de réalisation et d'analyse des résultats, facilité et faible coût de réalisation.

L'analyse de la bibliographie nous a montré que peu de méthode avait été développée spécifiquement pour des suivis écologiques des populations de légionelles. Parmi les méthodes développées pour l'identification des sous-espèces de légionelles, l'Infrequent Restriction Site PCR (IRS PCR) semble posséder, aux vues des études réalisées sur cette méthode (Mazurek *et al.*, 1996; Riffard *et al.*, 1998b; Yoo *et al.*, 1999; Handley et Regnery, 2000; Moissenet *et al.*, 2003) (à la fois sur le génome des *Legionella* et autres genres), des caractéristiques adaptées aux objectifs de notre étude :

- résolution taxonomique au niveau des sous-espèces de *Legionella* ;
- fort pouvoir discriminant ;
- bonne reproductibilité
- facilité et rapidité de réalisation et d'analyse des résultats;
- faible coût.

2. METHODOLOGIE

Dans un premier temps, l'IRS PCR a été testée sur un grand nombre de souches (principalement des *L. pneumophila* issues de CRF) dans le but de valider cette méthode en tant qu'outil de choix pour une étude écologique de grande échelle. Simultanément, les caractéristiques de l'IRS PCR ont été évaluées (reproductibilité, pouvoir discriminant). La capacité phylogénétique de l'IRS PCR a été déterminée par comparaison des dendogrammes issus du typage IRS PCR et du séquençage du gène de l'ARNr 16S de neuf *Legionella* de différentes espèces provenant de l'Institut Pasteur.

Dans un deuxième temps, la méthode a été comparée aux méthodes de référence de typage de légionelles, la PFGE et le typage basé sur les séquences (Sequence Based Typing - SBT). Cette inter-comparaison sert de validation finale de l'IRS PCR.

3. RESULTATS

L'ensemble de cette étude montre que l'IRS PCR peut être considérée comme une nouvelle méthode de classification des souches de légionelles. Cette méthode permet de distinguer les espèces de *Legionella* mais n'est pas discriminante au niveau du séro groupe des *L. pneumophila*. Elle ne possède pas la capacité de grouper les souches en fonction de leur phylogénie. L'inter-comparaison des trois méthodes a montré que l'IRS PCR, avec un pouvoir discriminant de 0.992, possède des caractéristiques semblables voire meilleures que celles des méthodes de référence. La reproductibilité de l'IRS PCR est inférieure à la PFGE et à la SBT mais elle reste acceptable (>95%). A l'inverse de la PFGE et de la SBT, l'IRS PCR est une méthode rapide (résultats en deux jours après la culture des souches), simple et peu chère. Sur la base de cette évaluation, l'IRS PCR a montré sa bonne applicabilité pour le typage des sous-populations de légionelles dans le cadre d'une étude écologique de grande échelle.

La validation de l'IRS PCR par inter-comparaison avec les méthodes de référence, a fait l'objet de plusieurs posters présentés lors de congrès internationaux (LEGIONELLA 2009 à Paris, FEMS 2011 à Genève et SYMPOLEGIO 2011 à Lyon) ainsi que d'une publication présentée ci-dessous, publiée chez *Letters in Applied Microbiology*.

ORIGINAL ARTICLE

Validation of IRS PCR, a molecular typing method, for the study of the diversity and population dynamics of *Legionella* in industrial cooling circuits

D. Jakubek^{1,2}, M. Le Brun¹, G. Leblon², M. DuBow² and M. Binet¹

¹ Département LNHE, EDF R&D, Chatou, France

² Univ Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Orsay Cedex, France

Significance and Impact of the Study: IRS PCR, unlike PFGE and SBT, is a suitable tool for the ecological study of *Legionella pneumophila* in a large scale. It will be helpful to investigate diversity and dynamics of *Leg.* populations in water systems where these bacteria are strongly represented, as in cooling circuits.

Keywords

bacterial typing techniques, infrequent restriction site PCR, *Legionella*, pulsed-field gel electrophoresis, sequence-based typing.

Correspondence

Delphine Jakubek, EDF R&D, Laboratoire National Hydraulique et Environnement, 6 quai Watier, 78400 Chatou, France.
E-mail: delphine.jakubek@edf.fr

2012/1367: received 31 July 2012, revised 31 October 2012 and accepted 31 October 2012

doi:10.1111/lam.12025

Abstract

Legionella bacteria are ubiquitous in aquatic environments. Members of the species *Legionella pneumophila* are responsible for more than 98% of cases of Legionnaires' disease in France. Our objective was to validate a molecular typing method called infrequent restriction site PCR (IRS PCR), applied to the study of the ecology of *Legionella* and to compare this method with reference typing methods, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and sequence-based Typing (SBT). PFGE and SBT are considered as gold methods for the epidemiological typing of *Leg. pneumophila* strains. However, these methods are not suitable to an ecological monitoring of *Legionella* in natural environments where a large number of strains has to be typed. Validation of IRS PCR method was performed by the identification of 45 *Leg. pneumophila* isolates from cooling circuits of thermal power plants by IRS PCR, PFGE and SBT. The parameters of each method were measured and compared to evaluate the effectiveness of IRS PCR. The results of this study showed that IRS PCR has a discriminating power similar or better than that of the reference methods and thus that, by its speed and low cost represents an appropriate tool for the study of the ecology of *Legionella* in cooling circuits.

Introduction

Legionella pneumophila bacterium, the causative agent of a severe atypical pneumopathy known as 'Legionnaires' disease' is responsible for more than 98% of cases of Legionnaires' disease in France (Campese *et al.* 2010). Bacteria of the genus *Legionella* are hydrotelluric, found in natural (lakes, rivers, etc.) and also artificial (hot water distribution systems, cooling towers, etc.) aquatic environments (Che *et al.* 2009).

The cooling circuits of thermal power plants are considered as the biggest cooling system for their dimensions (volume and flow rates). In France, these systems are fed by water from natural sources as rivers or oceans, which

after flow through the cooling circuit, is then discharged back into the environment. Due to this process, *Leg. pneumophila* found in this equipments suitable conditions of proliferation including nutrients (suspended solids, organic matter), favourable growth temperature (30–50°C for hot parts and 18–38°C for cold parts), and the presence of oxygen. Although no case of Legionnaires' disease has been linked to the presence of this pathogen in cooling circuits of thermal power plants in France, it is necessary to improve our knowledge on the ecology of *Legionella* by establishing an inventory of their population diversity and dynamics associated with their environment. A molecular approach based on genetic polymorphisms of *Legionella spp* seems useful to the study of their ecology.

Many methods of *Legionella* molecular typing have been developed for epidemiological studies. Among these, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and sequence-based typing (SBT) are regarded as reference methods for the identification of clinical isolates of *Leg. pneumophila*. Although PFGE is time consuming and a lack of inter-gel reproducibility has been well documented (De Zoysa and Harrison 1999; Fry et al. 1999), and SBT is considered expensive and analysis of sequencing results can be fastidious, these two methods are often used as the reference methods for validating other typing schemes because of their high discrimination power, their good reproducibility and their epidemiological concordance (Pruckler et al. 1995; Maes et al. 1998; Lawrence et al. 1999; Gaia et al. 2003, 2005; Afshar et al. 2007). Although PFGE and SBT are widely used in epidemiology, they are not suitable to an ecological study where a large number of strains have to be typed in a short time.

Moreover, the characteristics of water flow in the cooling circuits of thermal power plants, water rich in suspended solids, presence of PCR inhibitors, make it difficult to undertake an analysis, without prior culture, of *Legionella* present in the circuits. Thus, among the methods developed for molecular typing of *Legionella* after cultivation, infrequent restriction site PCR (IRS PCR) appears to have the characteristics (discriminating power, reproducibility, typability...) equivalent to those of PFGE and SBT. Unlike PFGE and SBT, the IRS PCR method appears to be fast, easy and inexpensive to perform. It seems to be a method of choice for ecological monitoring of *Legionella* populations. IRS PCR consists of a selective amplification of sequences flanked by two

restriction sites that are rarely and frequently represented in the genome of *Legionella*. The digested and amplified fragments are then separated by electrophoresis.

In this study, we propose a comparative analysis of IRS PCR vs PFGE and SBT, with the aim to evaluate capacity of IRS PCR to perform ecological studies of *Legionella* subpopulations.

Results and discussion

Legionella typing by the three methods

We characterized a total of 45 strains of *Leg. pneumophila* using IRS PCR, PFGE and SBT procedures (Table S1).

IRS PCR consists in the double digestion of *Legionella* DNA by a pair of restriction enzymes (*Xba*I and *Pst*I), followed by an adapter ligation step and a PCR amplification using primers complementary to adapters. PFGE method consists in the macrorestriction of *Legionella* DNA with *Sfi*I. Digested DNA is then separated by pulsed-field gel electrophoresis on agarose gel. The 45 *Leg. pneumophila* profiles generated by IRS PCR and PFGE consisted of 11 ± 3 bands ranging in size between 50 and 800 bp (Fig. 1c) and 10 ± 2 bands ranging between 50 and 1000 kb (Fig. 1b), respectively.

SBT typing consists in sequencing seven genes belonging to *Leg. pneumophila* genome. Alleles were assigned for each gene depending on polymorphic sites (Fig. 1a). The number of polymorphic sites differed, depending on the gene studied (from 21 to 42 polymorphic sites) and the frequency of polymorphic sites ranged from 5 to 14%, with the most variable gene being *flaA* and the least one being *mip* (Table S2).

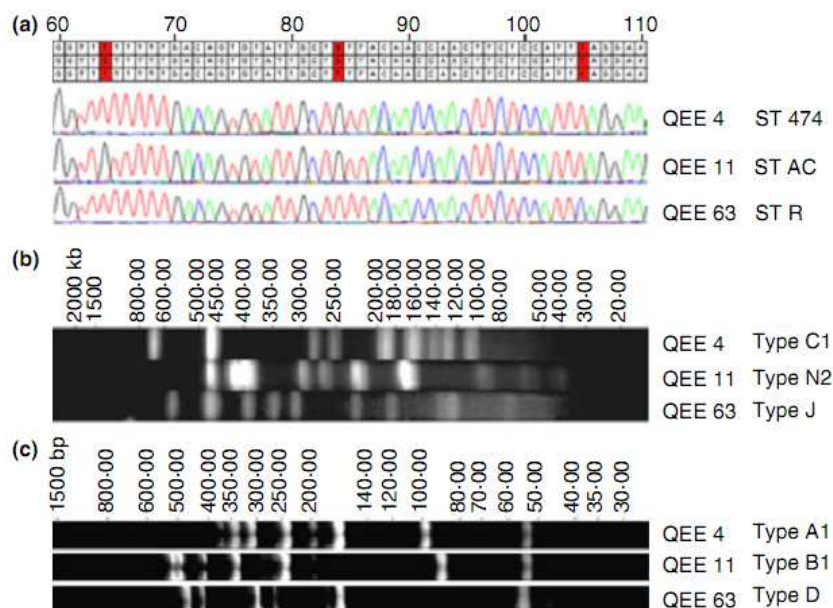


Figure 1 Fingerprints for three isolates, QEE 4, QEE 11 and QEE 63 generated using the three different molecular typing techniques. To the right of each fingerprint is indicated the fingerprint type. (a) Fragment of *neuA* sequence containing three nucleotide differences between the three isolates. (b) PFGE profiles for the three isolates. (c) IRS PCR profiles for the three isolates.

Reproducibility of the methods

To determine the reproducibility of the three typing methods, two *Leg. pneumophila* reference strains (ATCC 33823 and ATCC 33152) and one *Leg. pneumophila* environmental strain, QEE 1482, were analysed by IRS PCR (20 replicates), PFGE and SBT (10 replicates for both methods).

Reproducibility of SBT and PFGE typing was 100% both, whereas reproducibility of IRS PCR for *Leg. pneumophila* strains ATCC 33152, ATCC 33823 and QEE 1482 was 100%, 100% and 89.5%, respectively, yielding an average IRS PCR reproducibility of 96.5%.

Thus, the values of reproducibility assays were all high. IRS PCR reproducibility was lower than that of PFGE and SBT, but still acceptable (>95%). Moreover, assays of IRS PCR reproducibility were confirmed using 80 replicates on different strains vs 30 for PFGE and SBT.

Discriminating power of the methods

For the 45 *Leg. pneumophila* strains, SBT analysis yielded 39 types and 12 alleles for the *flaA* gene, 6 for *pilE*, 10 for *asd*, 16 for *mip*, 11 for *mompS*, 12 for *proA* and 10 alleles for the *neuA* gene (Table S1). Individual and combined discriminatory indices were calculated for the seven genes (Table 1). Individual discriminatory indices ranged from 0.742 [0.679; 0.805]_{95%} for the *pilE* gene to 0.891 [0.857; 0.925]_{95%} for the *mompS* gene. The SBT discrimination index for the seven genes was 0.992 [0.983; 1.001]_{95%} and was slightly increased by the addition of serogroups (Table 1).

PFGE typing determined a total of 21 types when a three-band difference was used, whereas 28 subtypes were distinguished when a one-band difference was used to define PFGE profiles (Table S1). Thus, the discriminatory index was 0.948 [0.923; 0.974]_{95%} on the basis of three-band differences and 0.974 [0.959; 0.988]_{95%} on the basis of a one-band difference. The addition of serogroups in determining PFGE patterns did not significantly increase the discriminating power (Table 1).

For *Leg. pneumophila* strains identified by IRS PCR, when a three-band difference was used to distinguish IRS PCR types, a total of 29 types were recognized (Table S1) and the discriminatory index was 0.971 [0.951; 0.990]_{95%}. Forty subtypes were obtained when a one-band difference was used to distinguish IRS PCR subtypes (Table S1) and the discriminatory index was 0.992 [0.983; 1.001]_{95%}. When tested on a group of strains containing both *Leg. pneumophila* and other species, IRS PCR shows a strong discrimination at the species level, with specific types and subtypes for *Leg. pneumophila* and *Legionella* spp (data not shown). The discriminatory index did not

Table 1 Indices of discrimination (*D*) calculated from the 45 *Legionella pneumophila* strains typed by IRS PCR, PFGE, SBT and its seven genes

Method	<i>D</i>	σ^2	95% CI
IRS PCR	0.992	2.176E10 ⁻⁵	[0.983; 1.001]
IRS PCR + Serogroup	0.992	2.176E10 ⁻⁵	[0.983; 1.001]
PFGE	0.974	5.649E10 ⁻⁵	[0.959; 0.988]
PFGE + Serogroup	0.975	5.896E10 ⁻⁵	[0.960; 0.990]
SBT	0.992	2.176E10 ⁻⁵	[0.983; 1.001]
<i>flaA</i>	0.835	0.0011	[0.772; 0.899]
<i>pilE</i>	0.742	0.0010	[0.679; 0.805]
<i>asd</i>	0.801	0.0011	[0.737; 0.865]
<i>mip</i>	0.877	0.0008	[0.821; 0.933]
<i>mompS</i>	0.891	0.0003	[0.857; 0.925]
<i>proA</i>	0.776	0.0031	[0.667; 0.884]
<i>neuA</i>	0.855	0.0005	[0.809; 0.900]
SBT + Serogroup	0.995	1.344E10 ⁻⁵	[0.988; 1.002]

σ^2 , standard deviation; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; SBT, sequence-based Typing.

increase when serogroups are added to distinguish types (Table 1).

Thus, PFGE, SBT and IRS PCR displayed very high degrees of discrimination ($D > 0.95$), demonstrating their ability to distinguish environmental *Leg. pneumophila* strains. Previous studies have focused on *Legionella* diversity among clinical and environmental strains. Values of discriminating power reported in this study were in the range of that reported by earlier studies (Selander *et al.* 1985; Riffard *et al.* 1998; De Zoysa and Harrison 1999; Aurell *et al.* 2005; Harrison *et al.* 2007).

Congruence and agreement between methods

Dendograms produced from cluster analyses of environmental *Leg. pneumophila* strains by IRS PCR, PFGE and SBT are represented in Fig. 2. IRS PCR clustered *Leg. pneumophila* strains at a similarity value of 30%, whereas PFGE did so at approximately 50%. SBT typing clustered strains with a relatedness of 98%, meaning that 50 nucleotides among the 2501, which composed the merged sequences differed between the most distant strains. Topologies of trees obtained by the three methods were different and clusters were not consistent. PFGE technique divided both some IRS PCR types, as well as SBT types, into different types. Isolates identified by PFGE as types E, D and U were divided into four, four and two IRS PCR types, respectively, and into four, five and two SBT types, respectively. Moreover, these PFGE types belonged to separate clusters when typed by the other two methods. For example, PFGE type called E was divided into four IRS PCR types (AB, C, N and W) clustered in two different groups with a relatedness of

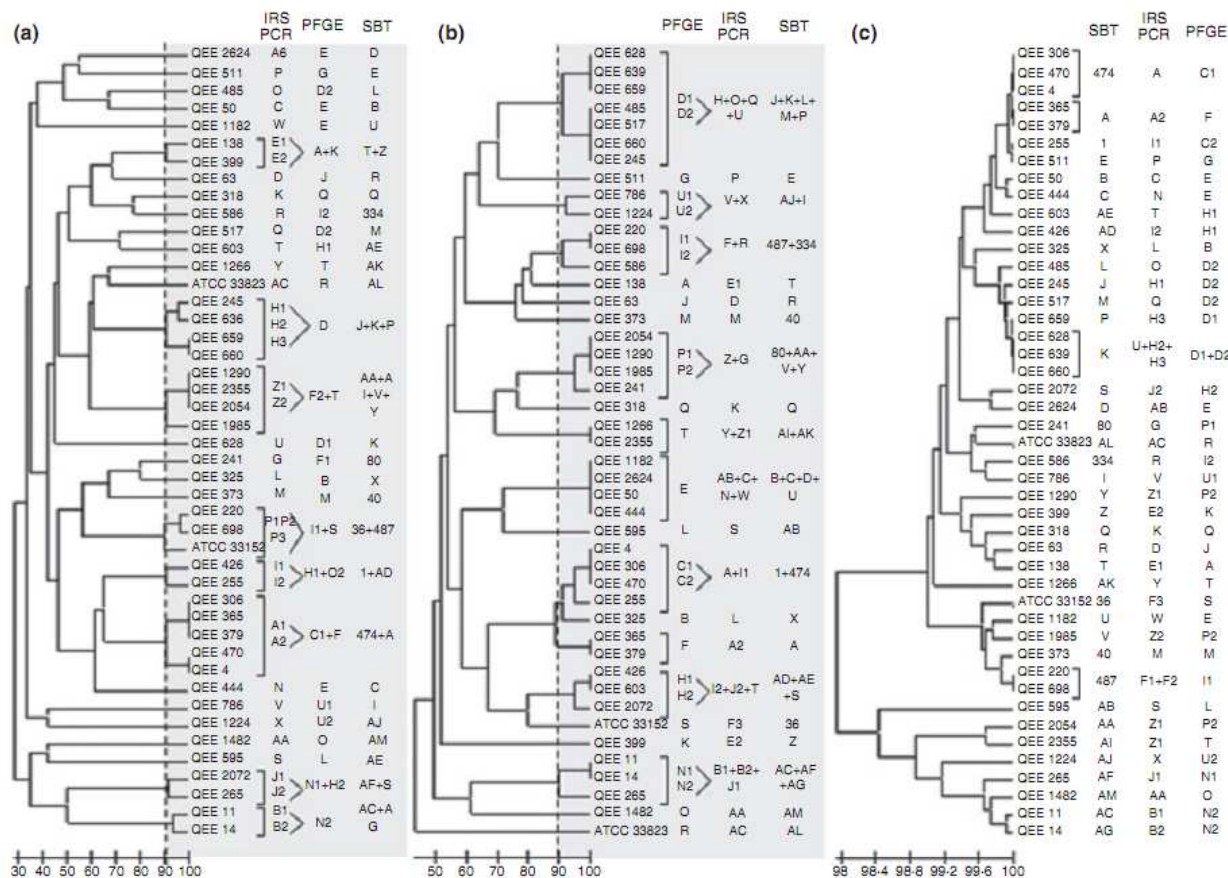


Figure 2 UPGMA trees showing the relationship between (a) IRS PCR and (b) PFGE generated profiles and (c) the genetic relationship between the merged sequence of the seven gene fragments used for SBT typing from 45 *Legionella pneumophila* isolates. For (a) and (b), the scale bar represents the band-based Dice similarity coefficient (%). Types are defined as profiles differing in up to three bands that correspond to a similarity of 90%. Subtypes are defined as identical profiles. For (c), The scale bar represents percentage of similarity (%) based on the number of nucleotides differing between merged sequences. At the tip of each branch are indicated the name of each strain, IRS PCR, PFGE and SBT types.

only 30%. As well, these isolates were separated into four SBT types (B, C, D and U), which were clustered in different groups with a relatedness of 99% (corresponding to a difference of 25 nucleotides between the merged sequences). Identifications performed by IRS PCR and SBT techniques were more congruent. Although SBT method identified IRS PCR types in a different manner, strains belonged to a same IRS PCR type were closed in the dendrogram produced by SBT cluster analysis. *Legionella pneumophila* strains belonged to the IRS PCR type A (A1 and A2) were differently identified by SBT method into two types, which exhibited a similarity value >99.9%. As well, three strains were identified by IRS PCR as three distinct types with a similarity >90% (types F1–F3). These strains were clustered by SBT in the same group, with a relatedness of 99.6%.

Thus, a low level of congruence was observed among the three techniques examined. Nevertheless, cluster analysis showed that IRS PCR method was in general agreement

with SBT, whereas PFGE clustered strains in a very different manner compared with other methods. This result is inconsistent with previous studies (Riffard *et al.* 1998; Aurell *et al.* 2005; Scaturro *et al.* 2005; Casini *et al.* 2008). Those studies have shown that IRS PCR, PFGE and SBT were both able to differentiate unrelated strains and to cluster related strains in a same group. In our study, we used *Legionella* strains isolated from different complex environmental samples and suspected to be unrelated as they come from various rivers, different cooling circuits of various thermal power plants and isolated at different dates from 2005 to 2010. Given that strains chosen for this study were not related and were expected to be very diverse and that separate typing methods use different sources of genetic variation to produce genetic profiles, the lack of agreement between typing methods is, thus, not surprising. In addition, the low congruence between methods suggests that no method is redundant and that each method contributes to additional information.

To conclude, it appeared that IRS PCR is a rapid, easy and inexpensive typing method. With a discriminating power of 0.992 and a reproducibility of 96.5%, this method has shown its ability to type environmental strains of *Leg. pneumophila* on a large scale. For ecological studies where a large number of isolates must be analysed, the price, speed and ease of implementation of the chosen method must be taken into consideration. IRS PCR was the least laborious method in comparison with both PFGE and SBT. It was possible to have results within 2 days, including analysis time. IRS PCR has a discriminatory power equivalent to or greater than SBT and PFGE. It presented a correct reproducibility. The statistical data for the different typing methods indicate that IRS PCR and SBT are the most suitable techniques for environmental *Leg. pneumophila* strain typing. Discrimination between *Legionella* species and strains, speed, ease of implementation and the inexpensive cost of IRS PCR make this method an ideal technique for ecological studies of *Legionella* on a large scale.

Materials and methods

Legionella strains

Forty-five strains of *Leg. pneumophila* were used to perform the intercomparison between IRS PCR and the two reference methods, PFGE and SBT. Among these 45 strains, two are type strains: ATCC 33823, *Leg. pneumophila* Chicago 8 and ATCC 33152, *Leg. pneumophila* Philadelphia 1, which were obtained from the collection of the Pasteur Institute, France (Table S1). Other strains of *Leg. pneumophila* were isolated from May 2005 to July 2010 from samples of water, mud or biofilms collected in cooling circuits of thermal power plants. These strains were collected from samples inoculated on GVPC media and were identified according to the AFNOR Standard method NF 90-431 (Association Française de Normalisation 2006). Briefly, collected strains were transferred to BCYE medium, BCYE medium without cysteine and blood agar medium to clearly identify the *Legionella* genus. Latex agglutination tests have been used to differentiate between *Leg. pneumophila* from non-*Leg. pneumophila* species and to determine their serogroups. *Legionella* species from Collections, other than *Leg. pneumophila* were also tested for validation of IRS PCR (data not shown).

IRS PCR typing

IRS PCR patterns were obtained by a modified technique of Riffard *et al.* (1998). Briefly, after culture of *Legionella* strains on BCYE α for 72 h, bacteria were lysed and genomic DNA was extracted and purified using the commercial

DNeasy Blood & Tissue[®] kit from Qiagen[®] (Hilden, Germany). Extracted DNA was double digested for 90 min at 37°C with 40 U of *Xba*I (which frequently cleaves *Legionella* DNA) plus 40 U of *Pst*I (which infrequently cleaves *Legionella* DNA). Following digestion, an adapter ligation step was performed. *Xba*I adapters (called AX) and *Pst*I adapters (called PS) were constructed as previously described by Riffard *et al.* (1998), and designed to specifically ligate to the cohesive ends of the cleaved fragments. The sample was further digested with 10 U of *Xba*I plus 10 U of *Pst*I at 15°C for 15 min. The DNA was then subjected to PCR amplification with primers complementary to the adapters (initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at 60°C for 30 s, extension at 72°C for 90 s and a final extension step at 72°C for 7 min). After amplification, DNA fragments were separated by vertical electrophoresis in 3.5% polyacrylamide gels for 4 h at 120 V. The gels were stained in a 3 $\times$ Gel Red solution (Biotium, Hayward, USA) for 15 min and photographed under UV illumination. All experiments included negative (without DNA) and positive (DNA of strains with known IRS PCR patterns) controls, which were processed with the samples.

PFGE typing

Genomic DNA was prepared by a modified procedure of Schoonmaker *et al.* (1992). After harvesting and washing, cells were lysed in 1.8% agarose plugs (Lonza, Basel, Switzerland) for 18 h at 55°C with 0.6 mg of proteinase K (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Genomic DNA was digested with 50 U *Sfi*I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for 18 h at 50°C. DNA fragments were then separated by PFGE using a contour-clamped homogeneous electric field apparatus (CHEF-DR III; Bio-Rad, Hercules, CA) in a 0.8% agarose gel. The initial pulse time of 2 s was linearly increased to 35 s over 15 h at 150 V. The second pulse time of 35 s was increased to 60 s over 9 h at 150 V. The gels were stained with SYBR Green (1/10 000^e) (Sigma Aldrich) for 15 min and photographed under UV illumination.

SBT typing

The SBT protocol used in this study was proposed by Gaia *et al.* (2003, 2005) and Ratzow *et al.* (2007) and is used for epidemiological typing of *Leg. pneumophila* by the European Working Group for *Legionella* Infection (EWGLI). Briefly, genomic DNA was extracted then amplified in the forward and reverse sense using primers targeting seven specific gene loci (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) (Table S3). The sequences were obtained on an ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems – Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) by GATC Biotech (Konstanz, Germany).

Data processing

PFGE and IRS PCR patterns were analysed by the GEL COMPAR II ver. 6.0 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). PFGE and IRS PCR fingerprints from the different gels were interpreted via differences in banding patterns according to published guidelines (Tenover *et al.* 1995; Struelens 1996). In case of no differences between banding patterns, strains were considered identical. When differing in four or more fragments, strains were considered separate types. Strains differing in up to three fragments only were considered as subtypes. A capital letter was used to define a distinct type and a numerical suffix indicated the subtype profiles.

For SBT typing, sequence analyses were conducted using the MEGA ver. 4 sequence alignment editor (Tamura *et al.* 2007). For each gene of *Leg. pneumophila*, identical sequences (100% match) were assigned the same allele number defined by the online EWGLI SBT database, while different sequences were assigned distinct allele numbers as suggested by Gaia *et al.* (2003, 2005) and Afshar *et al.* (2007). If an allele was not present in the EWGLI SBT database, a letter is entered into the allelic profile. For each isolate, the combination of alleles at each of the loci was defined as the sequence-based type (SBT) using a predetermined order: *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* and *neuA*. A sequence-based type not identified in the EWGLI SBT database was represented by a letter.

Determination of reproducibility and discriminatory ability

To determine the reproducibility of the three typing methods, two *Leg. pneumophila* reference strains (ATCC 33823 and ATCC 33152) and one *Leg. pneumophila* environmental strain, QEE 1482, were analysed by IRS PCR, PFGE and SBT. For IRS PCR, strains were typed at least 20 times by two operators in different runs, whereas for PFGE, strains were typed 10 times. For SBT typing, the seven genes of each strain were independently sequenced 10 times.

IRS PCR and PFGE reproducibility was defined as the average for each strain of the percentage of concordant types. SBT reproducibility was defined as the average for each gene of the percentage of identical sequences.

The index of discriminatory ability was calculated as described by Hunter and Gaston (1988) on the basis of the type distribution among the 45 strains of *Leg. pneumophila*. Confidence intervals were calculated using the formulas originally described by Simpson (1949).

Acknowledgements

The authors would like to thank Emilie Lehericey (EDF R&D), who is particularly acknowledged for technical

support. We also thank the members of the CNRL (Centre National de Référence des *Legionella*, Lyon), including Sophie Jarraud and Monique Reyolle to train us on the *Legionella* reference typing methods, PFGE and SBT.

References

- Afshar, B., Fry, N.K., Bellamy, W., Underwood, A.P. and Harrison, T.G. (2007) External quality assessment of a DNA sequence-based scheme for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* by an international network of laboratories. *J Clin Microbiol* **45**, 3251–3256.
- Association Française de Normalisation (2006) Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila*: Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. NF T90-431.
- Aurell, H., Farge, P., Meugnier, H., Gouy, M., Forey, F., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J. *et al.* (2005) Clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 cannot be distinguished by sequence analysis of two surface protein genes and three housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* **71**, 282–289.
- Campese, C., Maine, C. and Che, D. (2010) Les cas de légionellose déclarés en France en 2009. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* **31–32**, 334–335.
- Casini, B., Valentini, P., Baggiani, A., Torracca, F., Lorenzini, C., Frateschi, S., Matteoli, B. and Privitera, G. (2008) Comparison of two molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* 1 strains isolated from a hospital water supply. *Water Sci Technol* **58**, 683–688.
- Che, D., Campese, C. and Jarraud, S. (2009) Légionelles et légionellose: qu'a-t-on découvert depuis 30 ans ? *Pathol Biol (Paris)* **59**, 134–136.
- De Zoysa, A.S. and Harrison, T.G. (1999) Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by pulsed-field gel electrophoresis with SfiI and comparison of this method with restriction fragment-length polymorphism analysis. *J Med Microbiol* **48**, 269–278.
- Fry, N.K., Alexiou-Daniel, S., Bangsberg, J.M., Bernander, S., Pastoris, M.C., Etienne, J., Forsblom, B., Gaia, V. *et al.* (1999) A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. *Clin Microbiol Infect* **5**, 462–477.
- Gaia, V., Fry, N.K., Harrison, T.G. and Peduzzi, R. (2003) Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J Clin Microbiol* **41**, 2932–2939.
- Gaia, V., Fry, N.K., Afshar, B., Luck, P.C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R. and Harrison, T.G. (2005) Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **43**, 2047–2052.

- Harrison, T.G., Doshi, N., Fry, N.K. and Joseph, C.A. (2007) Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. *Clin Microbiol Infect* **13**, 78–85.
- Hunter, P.R. and Gaston, M.A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**, 2465–2466.
- Lawrence, C., Ronco, E., Dubrou, S., Leclercq, R., Nauciel, C. and Matsiota-Bernard, P. (1999) Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the nosocomial environment by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* **48**, 327–333.
- Maes, N., Wauters, G. and Struelens, M.J. (1998) Evaluation of arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis for typing *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Infect* **4**, 149–154.
- Pruckler, J.M., Mermel, L.A., Benson, R.F., Giorgio, C., Cassiday, P.K., Breiman, R.F., Whitney, C.G. and Fields, B. S. (1995) Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J Clin Microbiol* **33**, 2872–2875.
- Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J.H., Fry, N.K. and Luck, P.C. (2007) Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminate cytidyltransferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* **45**, 1965–1968.
- Riffard, S., Lo Presti, F., Vandenesch, F., Forey, F., Reyrolle, M. and Etienne, J. (1998) Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* **36**, 161–167.
- Scaturro, M., Losardo, M., De Ponte, G. and Ricci, M.L. (2005) Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of Legionellosis in Rome. *J Clin Microbiol* **43**, 5348–5350.
- Schoonmaker, D., Heimberger, T. and Birkhead, G. (1992) Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* **30**, 1491–1498.
- Selander, R.K., McKinney, R.M., Whittam, T.S., Bibb, W.F., Brenner, D.J., Nolte, F.S. and Pattison, P.E. (1985) Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **163**, 1021–1037.
- Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**, 688.
- Struelens, M.J. (1996) Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* **2**, 2–11.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596–1599.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. and Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**, 2233–2239.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Environmental and reference *Legionella pneumophila* strains used for IRS PCR, PFGE and SBT analysis. IRS PCR and PFGE types were determined based on three-band or one-band differences on electrophoretic patterns. Allelic profiles of *Leg. pneumophila* and sequence type from SBT analysis were identified using EWGLI database. Numbers represent allele types and sequence-based types identified in EWGLI, while letters represent new allele types and sequence-based types not identified in EWGLI.

Table S2. Oligonucleotide primers used for SBT typing of *Legionella pneumophila* strains.

Table S3. Sequence variation in genes used for SBT typing of *Legionella pneumophila*.

TABLE S1

Environmental and reference *L. pneumophila* strains used for IRS PCR, PFGE and SBT analysis. IRS PCR and PFGE types were determined based on 3-band or 1-band differences on electrophoretic patterns. Allelic profiles of *L. pneumophila* and sequence type from SBT analysis were identified using EWGLI database. Numbers represent allele types and sequence based types identified in EWGLI, while letters represent new allele types and sequence based types not identified in EWGLI.

Strain	Identification	IRS PCR pattern		PFGE pattern		SBT analysis							Sequence type
		(3-band difference)	(1-band difference)	(3-band difference)	(1-band difference)	Allele type							
						<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>momp_S</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	
Reference strains													
ATCC33823	<i>Lp</i> 7	AC	AC	R	R	2	6	17	14	12	8	1	AL
ATCC33152	<i>Lp</i> 1	F	F3	S	S	3	4	1	1	14	9	1	36
Environmental strains													
QEE 4	<i>Lp</i> 1	A	A1	C	C1	1	4	3	1	1	1	13	474
QEE 11	<i>Lp</i> 1	B	B1	N	N2	18	11	16	16	15	13	2	AC
QEE 14	<i>Lp</i> 1	B	B2	N	N2	B	14	16	16	15	13	2	AG
QEE 50	<i>Lp</i> 2 to 14	C	C	E	E	1	4	3	16	1	1	A	B
QEE 63	<i>Lp</i> 2 to 14	D	D	J	J	2	A	17	28	30	14	6	R
QEE 138	<i>Lp</i> 2 to 14	E	E1	A	A	6	A	21	3	9	14	9	T
QEE 220	<i>Lp</i> 1	F	F1	I	I1	3	6	1	28	14	11	11	487
QEE 241	<i>Lp</i> 2 to 14	G	G	P	P1	7	6	3	8	13	11	3	80
QEE 245	<i>Lp</i> 2 to 14	H	H1	D	D2	2	6	17	28	30	1	2	J
QEE 255	<i>Lp</i> 1	I	I1	C	C2	1	4	3	1	1	1	1	1
QEE 265	<i>Lp</i> 1	J	J1	N	N1	A	14	16	10	15	13	9	AF
QEE 306	<i>Lp</i> 1	A	A2	C	C1	1	4	3	1	1	1	13	474
QEE 318	<i>Lp</i> 1	K	K	Q	Q	2	A	3	28	9	4	11	Q
QEE 325	<i>Lp</i> 1	L	L	B	B	8	6	34	9	53	8	13	X
QEE 365	<i>Lp</i> 1	A	A2	F	F	1	4	3	1	2	1	13	A
QEE 373	<i>Lp</i> 1	M	M	M	M	3	6	1	14	14	9	11	40
QEE 379	<i>Lp</i> 1	A	A2	F	F	1	4	3	1	2	1	13	A
QEE 399	<i>Lp</i> 1	E	E2	K	K	6	A	17	1	1	D	1	Z
QEE 426	<i>Lp</i> 1	I	I2	H	H1	22	4	3	1	1	1	10	AD
QEE 444	<i>Lp</i> 2 to 14	N	N	E	E	1	4	3	16	1	1	1	C
QEE 470	<i>Lp</i> 1	A	A1	C	C1	1	4	3	1	1	1	13	474
QEE 485	<i>Lp</i> 2 to 14	O	O	D	D2	2	6	17	30	30	1	B	L
QEE 511	<i>Lp</i> 1	P	P	G	G	1	4	D	1	1	1	1	E
QEE 517	<i>Lp</i> 2 to 14	Q	Q	D	D2	2	6	17	30	30	1	A	M
QEE 586	<i>Lp</i> 1	R	R	I	I2	2	6	17	6	13	11	11	334
QEE 595	<i>Lp</i> 1	S	S	L	L	12	A	13	13	32	A	13	AB
QEE 603	<i>Lp</i> 2 to 14	T	T	H	H1	22	4	3	36	2	30	13	AE
QEE 628	<i>Lp</i> 2 to 14	U	U	D	D1	2	6	17	28	30	1	13	K
QEE 639	<i>Lp</i> 2 to 14	H	H2	D	D1	2	6	17	28	30	1	13	K
QEE 659	<i>Lp</i> 2 to 14	H	H3	D	D1	2	6	C	28	30	1	13	P
QEE 660	<i>Lp</i> 2 to 14	H	H3	D	D2	2	6	17	28	30	1	13	K
QEE 698	<i>Lp</i> 1	F	F2	I	I1	3	6	1	28	14	11	11	487
QEE 786	<i>Lp</i> 1	V	V	U	U1	2	6	17	16	12	12	2	I
QEE 1182	<i>Lp</i> 2 to 14	W	W	E	E	3	4	1	1	14	1	6	U
QEE 1224	<i>Lp</i> 1	X	X	U	U2	11	14	E	25	14	12	2	AJ
QEE 1266	<i>Lp</i> 2 to 14	Y	Y	T	T	2	6	17	B	7	4	1	AK
QEE 1290	<i>Lp</i> 2 to 14	Z	Z1	P	P2	3	A	1	1	2	11	9	Y
QEE 1482	<i>Lp</i> 2 to 14	AA	AA	O	O	11	14	16	25	15	13	1	AM
QEE 1985	<i>Lp</i> 2 to 14	Z	Z2	P	P2	3	4	1	A	14	11	9	V
QEE 2054	<i>Lp</i> 2 to 14	Z	Z1	P	P2	11	14	17	25	7	11	9	AA
QEE 2072	<i>Lp</i> 2 to 14	J	J2	H	H2	2	B	3	14	12	1	9	S
QEE 2355	<i>Lp</i> 2 to 14	Z	Z1	T	T	B	14	C	25	7	C	9	AI
QEE 2624	<i>Lp</i> 2 to 14	AB	AB	E	E	1	4	3	C	12	1	9	D

TABLE S2Oligonucleotide primers used for SBT typing of *L. pneumophila* strains.

Gene		Fragment size of amplified product (bp)	Fragment size of the region used to determine allele type (nt)	Region used for allele assignment	GenBank accession number of reference sequence	Primer name	Binding position of the primer	Primer sequence (5'-3')
<i>flaA</i>	flagellum A	394	182	653-749	X83232	flaA-587F flaA-960R	568-587 981-960	GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G
<i>pilE</i>	type IV pilin	459	333	103-435	AF048690	pilE-35F pilE-453R	12-35 471-453	CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA GCT GGC GCA CTC GGT ATC T
<i>asd</i>	aspartate semi-aldehyde deshydrogenase	575	473	538-1010	AF034213	asd-511F asd-1039R	487-511 1062-1039	CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC
<i>mip</i>	macrophage infectivity potentiator	558	402	117-518	AJ496265	mip-74F mip-595R	58-74 616-595	GCT GCA ACC GAT GCC AC CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C
<i>mompS</i>	outer membrane protein	648	352	523-1010	AF078136	mompS-509F mompS-1126R* mompS-1015R*	492-509 1140-1126 1032-1015	GAC ATC AAT GTG AAC TGG TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C CAG AAG CTG CGA AAT CAG
<i>proA</i>	Zn-metalloprotease	480	405	1134-1230	M31884	proA-1107F proA-1553R	1090-1107 1570-1553	GAT CGC CAA TGC AAT TAG ACC ATA ACA TCA AAA GCC
<i>neuA</i>	N-acetylneuraminate cytidyltransferase	459	354	229-583	A6017354	neuA-196F neuA-611R	176-196 634-611	CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC

* The primer *mompS*-116R is not used for the DNA sequencing reaction. For reverse sequencing reaction of the *mompS* gene, we used the primer *mompS*-1015R

TABLE S3Sequence variation in genes used for SBT typing of *L. pneumophila*.

Gene	Size (nucleotides) of region used to determine allele type	Number of allele types	Number of variable sites	% Sequence variation
<i>flaA</i>	182	12	26	14.3
<i>pilE</i>	333	6	35	10.5
<i>asd</i>	473	10	36	7.6
<i>mip</i>	402	16	21	5.2
<i>mompS</i>	352	11	42	11.9
<i>proA</i>	405	12	36	8.9
<i>neuA</i>	354	10	26	7.3

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

En parallèle de la détermination des caractéristiques de l'IRS PCR (pouvoir discriminant et reproductibilité) et de la validation de la méthode par inter-comparaison, la capacité phylogénétique de la méthode a été déterminée. Dans un premier temps, la capacité de la méthode à distinguer et à grouper les espèces de *Legionella* a été testée par l'analyse du dendrogramme issu du typage de *L. pneumophila* et de *L. spp.* (Figure 2-34). Le dendrogramme a été construit selon l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) sur la base des coefficients de similarité entre souches calculé par l'indice de Dice.

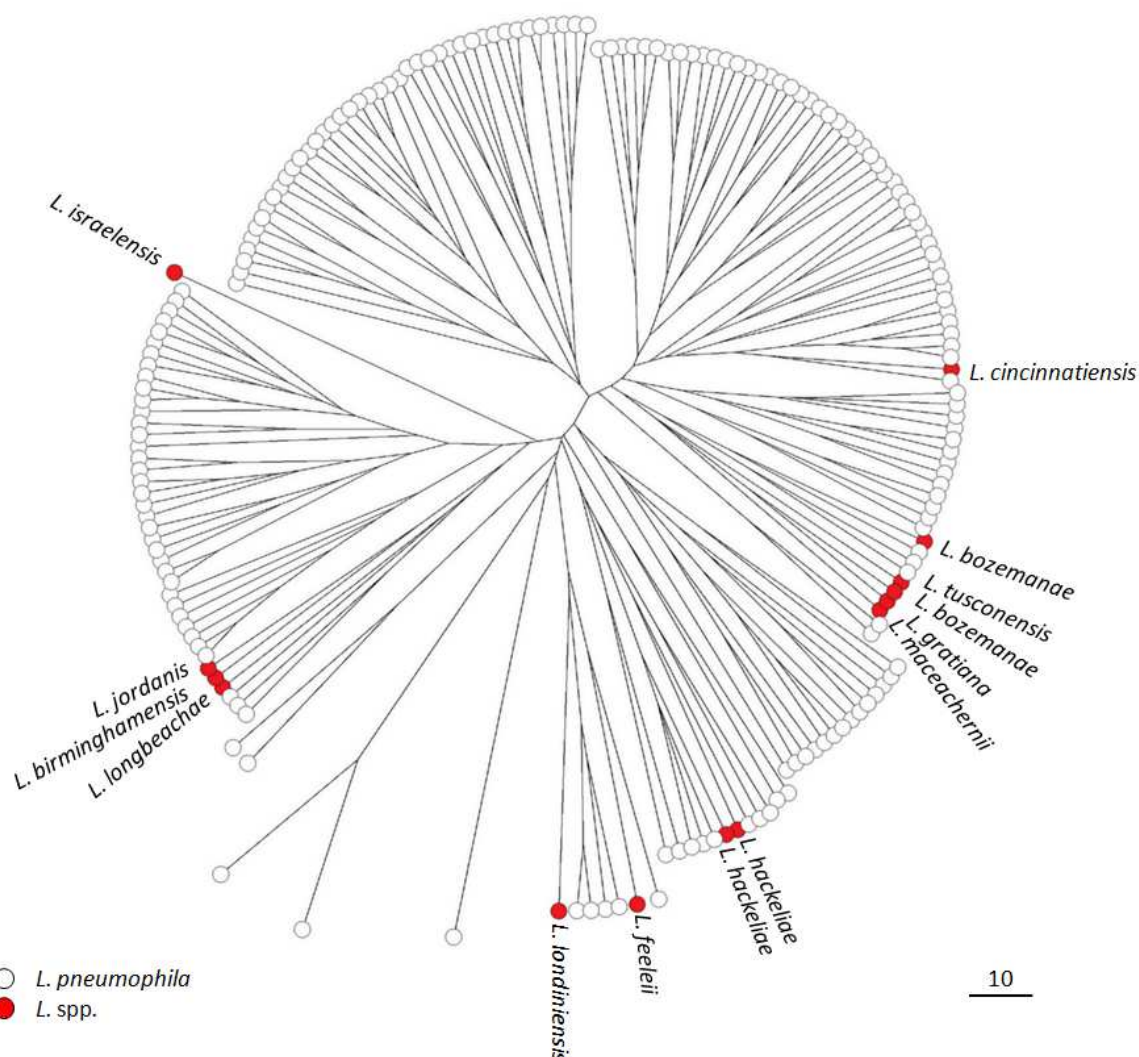


Figure 2-34 : Dendrogramme non enraciné des types de *L. pneumophila* et *L. spp.* identifiés par IRS PCR (matrice de similarité calculée par l'indice de Dice, dendrogramme construit selon l'algorithme UPGMA).

La méthode présente une bonne discrimination entre les différentes espèces de *Legionella*. Cependant, l'IRS PCR ne permet pas de grouper les souches en fonction de leur espèce. Il apparaît donc que cette méthode ne possède pas de pouvoir phylogénétique à ce niveau taxonomique. Ce résultat est confirmé par la comparaison des dendrogrammes issus du typage de différentes espèces de *Legionella* par IRS PCR et par le séquençage du gène de l'ARNr 16S (Figure 2-35). Comme présenté dans la figure ci-dessous, les deux méthodes ne

regroupent pas les différentes espèces de *Legionella* de la même manière, signifiant que l'IRS PCR ne possède pas de pouvoir phylogénétique au niveau taxonomique de l'espèce.

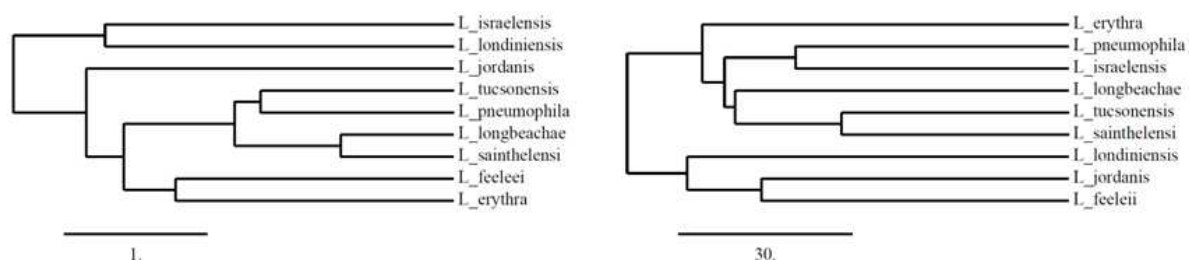


Figure 2-35 : Dendrogrammes issus du séquençage de l'ADNr 16S, à gauche (arbre construit par UPGMA à partir d'une matrice de similarité basée sur les différences nucléotidiques entre séquences) ; et du typage par IRS PCR, à droite (arbre construit par UPGMA à partir d'une matrice de similarité calculée par l'indice de Dice).

Il est à noter également que la méthode ne permet pas une distinction entre les sérogroupes des souches de *L. pneumophila*.

L'IRS PCR peut donc être considérée comme une nouvelle méthode de classification des souches de légionelles. Cette méthode permet de distinguer les espèces de *Legionella* mais n'est pas discriminante au niveau du séro groupe des *L. pneumophila*. Elle ne possède pas la capacité de grouper les souches en fonction de leur phylogénie.

ARTICLE 2:

**TEMPORAL DYNAMICS OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*
SUBPOPULATIONS IN NUCLEAR POWER PLANT COOLING
CIRCUITS LOCATED ON THE RIVER LOIRE**

**Delphine Jakubek, Matthieu Le Brun, Gérard Leblon, Michael
DuBow, Marie Binet**

Soumis pour publication, *Aquatic Microbial Ecology*

PRESENTATION DU TRAVAIL

Après avoir validé la méthode IRS PCR pour une étude écologique de grande échelle, les communautés de légionelles ont été analysées dans les CRF des quatre CNPE en bord de Loire. Une première partie de cette étude a, entre autre, consisté à suivre l'évolution dans le temps des sous-populations de légionelles dans les CRF non traités. Les paramètres abiotiques et biotiques mesurés permettent de lier l'évolution des sous-populations de légionelles et de leur concentration avec l'évolution de la qualité microbiologique et physico-chimique de l'eau des CRF.

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif final est de dégager des mécanismes hypothétiques de régulation des communautés de légionelles afin, éventuellement d'expliquer les évolutions dans les concentrations en légionelles et les différences de contamination observées entre CRF.

2. METHODOLOGIE

Les sous-populations de légionelles naturellement présentes sur circuits non traités ont été caractérisées dans les CRF des CNPE de Belleville-sur-Loire et de Dampierre-en-Burly. Avec un rythme mensuel, des prélèvements d'eau de bassin froid ont été réalisés. La concentration en légionelles a été déterminée selon les prescriptions réglementaires. Les sous-populations de légionelles ont été identifiées par la méthode IRS PCR et les paramètres de diversité ont été mesurés (indice de la richesse spécifique, de la diversité ainsi que de l'équitabilité, voir *Annexe XIII : Mesure de la biodiversité*). Associée à l'identification des sous-populations de légionelles dans l'eau des CRF, un certain nombre de paramètres physico-chimiques et microbiologiques ont été mesurés.

Pour faciliter l'analyse des relations entre les paramètres abiotiques, biotiques et les communautés de légionelles, un schéma général simplifié d'interactions entre les différents acteurs de l'écosystème a été utilisé. Alors que dans la réalité les interactions entre les différents acteurs abiotiques et biotiques d'un écosystème sont représentées sous forme de boucle, pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser un schéma d'interactions linéaires (Figure 2-36).

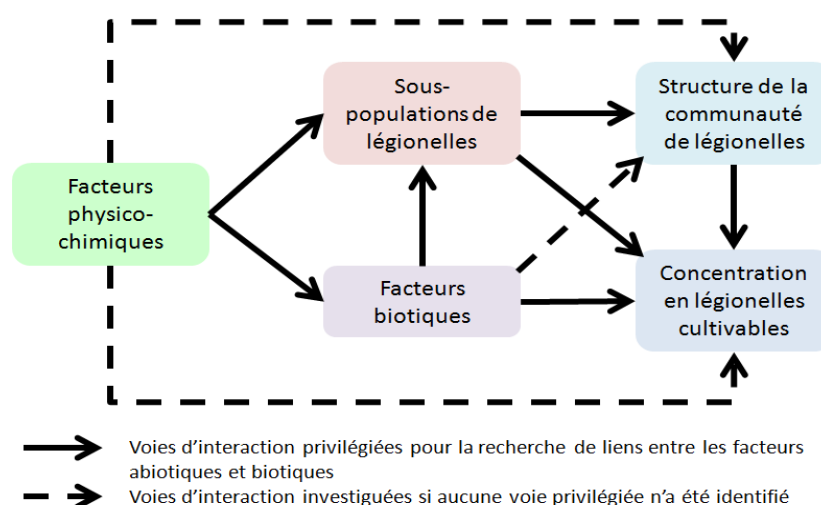


Figure 2-36 : Schéma général simplifié des différentes voies d'interaction entre les facteurs abiotiques et biotiques, utilisé pour la recherche de liens entre les communautés de légionelles et leur environnement.

3. RESULTATS

Les résultats de cette étude montre que les communautés de *L. pneumophila* présentes dans les CRF de Belleville et Dampierre présentent toutes deux un nombre important de sous-population. Ces deux communautés présentent une forte évolution annuelle de leur richesse spécifique alors que leur structure évolue moins fortement et paraît plus stable. Les mécanismes de régulation de la richesse et de la structure de ces communautés semblent être différents. En effet, à Belleville, seuls des mécanismes de régulation intra-communautaires ont été mis en évidence. A Dampierre, des mécanismes de régulation intra-communautaires semblent être responsables du degré d'équipartition entre les sous-populations mais la richesse de la communauté de *L. pneumophila* semble être influencée par des mécanismes de régulation environnementaux, et plus particulièrement la quantité de bactéries hétérotrophes présentes et la teneur en matières en suspension. Dans le CNPE de Belleville, la communauté de *L. pneumophila* présente une saisonnalité dans sa composition en sous-populations avec différentes périodes marquées par la présence de certaines sous-populations, telles qu'A3, AB8, AB13 et AB22. Ces sous-populations semblent présenter des sensibilités différentes aux paramètres physico-chimiques environnementaux et notamment ceux liés à la saison. Dans le CNPE de Dampierre, aucune saisonnalité n'a pu être mise en évidence.

Des schémas hypothétiques de régulation de la concentration en *L. pneumophila* par les paramètres abiotiques et biotiques ont pu être établis. Il apparaît ainsi que la concentration en *L. pneumophila* dans les deux CNPE est influencée positivement, de manière directe ou indirecte, par les paramètres de saison et par les concentrations en amibe et *Pseudomonas*. La flore hétérotrophe, dans les deux cas, présente une relation négative avec la concentration en *L. pneumophila*. Les évolutions d'abondance de certaines sous-populations, et notamment des sous-populations minoritaires, semblent être responsables des variations de concentrations en légionelles. Malgré la co-occurrence dans les deux CNPE de certaines de ces sous-populations (par exemple AB11, AB13 et AB8), leur lien avec l'évolution des concentrations en légionelles peut être différent. A Dampierre, le pH et la teneur en phosphate semble également influencer de manière négative et positive, respectivement, la concentration en légionelles. L'influence de ces deux paramètres n'apparaît pas dans le CNPE de Belleville.

De manière générale, l'ensemble de ces résultats suggèrent que les paramètres environnementaux, qu'ils soient abiotiques ou biotiques influencent de manière proche les concentrations en *L. pneumophila* dans les deux CNPE ; mais les mécanismes empruntés pour réguler la concentration semblent différents selon le CNPE étudié.

L'analyse de la communauté de légionelles dans les CRF de Belleville-sur-Loire a fait l'objet de plusieurs communications :

- **deux posters aux congrès SYMPOLEGIO 2011 (congrès international organisé par le CNRL du 15 au 16 Novembre 2011 à Lyon) et aux JOURNEES INFORMATIONS EAUX (JIE 2012 – congrès national organisé par l'APTEN du 25 au 27 Septembre 2012 à Poitiers) ;**
- **une publication en cours de soumission au journal *Aquatic Microbial Ecology*, présentées ci-dessous.**

TEMPORAL DYNAMICS OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* SUBPOPULATIONS IN NUCLEAR POWER PLANT COOLING CIRCUITS LOCATED ON THE RIVER LOIRE

Delphine Jakubek^{a, b*}, Matthieu Le Brun^a, Gérard Leblon^b, Michael DuBow^b and Marie Binet^a

^aEDF R&D, Département LNHE, 6, quai Watier, 78400 Chatou, France

^bUniv Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Bâtiment 409, 91405 Orsay cedex, France

* Corresponding author:

Delphine Jakubek

EDF R&D

Laboratoire National Hydraulique et Environnement

6 quai Watier

78400 Chatou, France

Email: delphine.jakubek@edf.fr;

Tel: + (33)130877519;

Fax: + (33)130877336.

RUNNING TITLE: Temporal dynamics of *Legionella* in cooling circuits.

KEYWORDS: *Legionella*, Diversity, Dynamics, IRS-PCR, Cooling circuit

ABSTRACT

Legionella bacteria are ubiquitous in aquatic environments. Among this genus, *Legionella pneumophila* is the causative agent of legionellosis disease and is responsible for more than 98% of such cases in France. *L. pneumophila* can be encountered in water in natural and artificial environments, such as in nuclear power plant cooling circuits. In published literature to date, no reports have been found dealing with research on the subtyping, dynamics and ecology of the *Legionella* genus in nuclear power plant cooling circuits. The aim of this study was to better define the diversity and dynamics of *L. pneumophila* populations to provide explanations for the observed *L. pneumophila* concentrations.

Cooling circuit water was sampled monthly to monitor the temporal diversity and dynamics of culturable *L. pneumophila* subpopulations over the course of one year. The molecular typing method, IRS-PCR, was chosen to identify a large set of *L. pneumophila* strains. This study showed a great diversity within the *L. pneumophila* community whose subpopulations seemed to evolve as a result of seasonal factors. No environmental factors (biotic or abiotic) were found to consistently influence the concentration. However, the culturable *L. pneumophila* concentration seemed to be influenced by a limited number of subpopulations. These subpopulations appeared themselves to be directly linked with biotic or abiotic factors. Strain-specific interactions with biotic factors and strain-specific sensitivities to abiotic factors appeared to be the key elements to a better understanding of the *L. pneumophila* concentrations in nuclear power plant cooling circuits.

INTRODUCTION

Nuclear power plant cooling circuits can promote the proliferation of thermophilic microorganisms. Due to the process within the circuits, microorganisms can find suitable conditions for their development, including nutrients (from suspended solids, organic matter, etc.), favourable growth temperatures (30 to 50°C for hot parts and 18 to 38°C for cold parts) and the presence of oxygen. Among these microorganisms, some can be pathogenic for humans, such as *Legionella pneumophila*, the causative agent of a severe atypical pneumopathy known as Legionnaires' disease. This species is responsible for more than 98% of cases of Legionnaires' disease in France (Campese et al. 2010). *L. pneumophila* is a Gram-negative coccobacillus belonging to the *Legionellaceae* family in the γ -proteobacteria class. This family consists of a single genus, *Legionella*, which includes 56 known species (Gomez-Valero et al. 2009). Bacteria of the genus *Legionella* are hydrotelluric and are found in both natural settings, such as lakes and rivers, and artificial aquatic environments, including hot water distribution systems and cooling towers (Che et al. 2009). Most studies have focused on the presence and development of *L. pneumophila* in man-made systems such as drinking water facilities (Sabria et al. 2001, Stojek & Dutkiewicz 2006), sanitary hot water networks (Bargellini et al. 2011, Schoen & Ashbolt 2011) or cooling towers (Ragull et al. 2007, Sanchez et al. 2008). The aim of these studies was essentially to improve our knowledge of the possible sources of legionellosis. In such systems, temperature (Borella et al. 2004, Mathys et al. 2008, Carducci et al. 2010, Wullings et al. 2011), the presence of metals such as iron or copper (Stout et al. 1992, Borella et al. 2004, Allard et al. 2009, Bargellini et al. 2011), the presence of biofilms (Stout et al. 1985, Cooper & Hanlon 2010) and protozoa such as amoebae (Yamamoto et al. 1992, Berk et al. 2006,

Moore et al. 2006) are known to be factors that can enhance *L. pneumophila* development. In natural aquatic environments, *L. pneumophila* proliferation factors are poorly understood. It is known that *Legionella* bacteria are able to survive in a wide range of environmental conditions, in terms of temperature, pH, etc. (Verissimo et al. 1991, Sheehan et al. 2005, Carvalho et al. 2006, 2008). *Legionella* bacteria use different strategies to survive, including intra-cellular replication in free-living amoebae (Harf & Monteil 1988, Molmeret et al. 2005), persistence in biofilms (Declerck et al. 2007, Declerck 2009) and entry into a viable but non-culturable state (Yamamoto et al. 1996, Dusserre et al. 2008).

Nuclear power plant cooling circuits are considered to be the largest cooling systems with respect to their volume and flow rates. These cooling systems are fed by water from natural sources (rivers or the sea), which flows through the pipes, cools the plants and is then discharged, after cooling, to the natural environment. Few studies have focused on the presence of *Legionella* bacteria in nuclear power plant cooling circuits (Bonnell & Rippon 1985, Deubner et al. 1986, Morton et al. 1986, Werner 1987). *Legionella* concentrations are usually examined in France by counting culturable *L. spp.* and *L. pneumophila* according to the French Standard methodology (Association Française de Normalisation 2006). This type of analysis can be used to monitor *Legionella* concentrations in cooling circuits, but does not permit a better understanding of factors underlying their proliferation.

In order to provide explanations for changes in the *L. pneumophila* concentrations observed in water flowing through nuclear power plant cooling circuits, it is necessary to better characterise their diversity and dynamics. To achieve this objective, *L. pneumophila* subpopulations were regularly monitored over a one-year period in nuclear power plant cooling circuits located on the River Loire in France. The characteristics of the water flow in cooling circuits make it difficult to analyse *Legionella* in the circuits without prior culture. Thus, *L. pneumophila* subpopulations were identified at the subspecies level, after culture, using a molecular typing method known as infrequent-restriction-site PCR (IRS-PCR), which was validated in a previous study for the ecological monitoring of *L. pneumophila* on a large scale (Jakubek et al. in press). At the same time, physicochemical and microbiological water characteristics were determined with the aim of identifying abiotic and biotic links between *L. pneumophila* dynamics and the environment. To the best of our knowledge, this study represents the first time that research into ecological factors, dynamics and interactions between *Legionella* subpopulations has been combined in order to characterise their ecology in nuclear power plant cooling circuits.

MATERIALS AND METHODS

STUDY SITE AND SAMPLE COLLECTION

The studied nuclear power plant cooling circuits are located on the River Loire, at 385 km from its source (site L, Figure 1). The power plant has two 1300 MW electricity production units and is located upstream from three other power plants on the same river (Figure 1). Water from the cooling circuits was sampled from the cold basins, upstream from the recirculating water pumps, where the water is mixed to the greatest degree (Figure 2). This sampling point was the same as that used for regulatory analyses. Samples were collected monthly from March 2010 to March 2011, preferably from electricity production unit number 2. However, this unit was not available between October and the end of December

2010. Thus, during this period, water was collected from electricity production unit number 1. Samples were named L1- or L2-MAR10 to L1- or L2-MAR11.

For each sample, microbiological parameters, *Legionella* concentrations and culturable *L. pneumophila* subpopulations were identified from six litres of water collected in sterile plastic bottles. Samples were processed in a mobile laboratory on the day of collection or were stored at 4°C for analysis 24 hours later. Some of the same samples were sent to an external laboratory (Laboratoire Ianesco, Poitiers) for chemical product analysis.

MEASUREMENT OF PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS

A set of physicochemical parameters was measured immediately during the sampling time. The water and air temperatures, pH, conductivity, oxygen saturation and dissolved oxygen concentration were determined using the Multi 350i portable multi-parameter instrument (WTW GmbH, Germany).

An external laboratory (Laboratoire Ianesco, Poitiers) performed different chemical analyses according to French Standard methodologies: concentrations of total and dissolved organic carbon (TOC, DOC), calcium and magnesium, biological and chemical demands for oxygen, suspended solids, nitrate, nitrite, ammonium, Kjeldahl nitrogen, phosphate and chlorophyll a.

DETERMINATION OF MICROORGANISM CONCENTRATIONS

Culturable *L. spp.* and *L. pneumophila* counts were determined using a modified procedure taken from the AFNOR Standard method (Association Française de Normalisation 2006). Briefly, 1ml of raw water, ten times diluted, was inoculated onto five GVPC media (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific, USA). Water samples of 300 to 900ml (depending on sample filterability) were concentrated by filtration through 0.45 µm pore-size polycarbonate filters (Sartorius AG, Germany). Membranes were transferred into 5ml of raw water and sonicated for 10 minutes (28 kHz). A volume of 500 µl of the concentrate, ten times diluted, was plated onto five GVPC media. Volumes (1ml) of different diluted concentrates were then plated onto five GVPC media after heat treatment (50°C for 30 minutes) and acid treatment (HCl 0.2 M, KCl 0.2 M, pH 2, for 5 minutes) to eliminate non-*Legionella* species. Plates were incubated at $36 \pm 2^\circ\text{C}$ and colonies were counted after three, five and ten days. Colonies exhibiting *Legionella* morphology were transferred to BCYE media, BCYE media without cysteine, and blood agar media (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific, USA) to clearly identify the *Legionella* genus. Latex agglutination tests (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific, USA) were used to differentiate *L. pneumophila* from non-*L. pneumophila* species and to determine their serogroups. The detection limit (DL) and the quantification limit (QL) of the method depended on the raw water volume filtered. When filtering 1 litre of raw water, the method's DL was one colony for the five plates inoculated per dilution, corresponding to 10 CFU.l⁻¹. Similarly, the method's QL corresponded to five colonies counted from the five plates inoculated per dilution. Thus, the QL of the method was 50 CFU.l⁻¹.

Concentrations of *Pseudomonas*, bacteria known to interact with *Legionella* in natural environments, were determined by directly plating 500 µl of diluted or non-diluted water on a selective medium called Cetrimide (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific, USA). Plates were incubated for two days at $36 \pm 2^\circ\text{C}$ and $30 \pm 2^\circ\text{C}$ to cover the entire

population of *Pseudomonas*. Due to technical constraints, no additional tests were performed to confirm the genus of bacteria isolated on the plates.

Amoebae concentrations were also determined. The most probable number (MPN) method described in Pournard et al. (2002) was used to enumerate thermophilic and non-thermophilic free-living amoebae.

Total heterotrophic bacterial counts were performed by inoculating diluted or non-diluted raw water onto a non-selective medium called R2A (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific, USA). The plates were incubated at two different temperatures (30 and $36 \pm 2^\circ\text{C}$) and colonies were counted after two and three days.

IDENTIFICATION OF CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* SUBPOPULATIONS

Culturable *L. pneumophila* subpopulations were identified using the IRS-PCR (infrequent-restriction-site PCR) technique, a molecular typing method developed by Mazurek et al. (1996) and adapted to the *Legionella* genome by Riffard et al. (1998). This method discriminates *L. pneumophila* subpopulations at the subspecies level and does not correlate with serogroups (data not shown). It has been validated in a previous work focusing on ecological studies of *Legionella* bacteria on a large scale (Jakubek et al. in press).

Briefly, after the culture of *Legionella* strains on BCYE for 72 hours at $36 \pm 2^\circ\text{C}$, the bacteria were lysed and genomic DNA was extracted and purified using the DNeasy Blood & Tissue® kit (QIAGEN®, Netherlands). Extracted DNA was double digested with XbaI (which frequently cleaves *Legionella* DNA) and PstI (which infrequently cleaves *Legionella* DNA) (Fermentas Molecular Biology Tools, Thermo Fisher Scientific, USA). Following digestion, an adaptor ligation step was performed. XbaI adaptors (AX) and PstI adaptors (PS) were constructed as previously described by Riffard et al. (1998) and were designed to specifically ligate to the cohesive ends of the cleaved fragments. The adaptors were prepared with oligonucleotides (Eurogentec, Belgium), AX1 (5'-CTA GTA CTG GCA GAC TCT-3') and AX2 (5'-GCC AGT A-3') or PS1 (5'-GAC TCG ACT CGC ATG CA-5') and PS2 (5'-TGC GAG-3'). After the ligation of the extracted DNA with the adaptors, a second digestion was performed with the same enzymes, XbaI and PstI. The DNA was then subjected to PCR amplification followed by vertical electrophoresis in polyacrylamide gels. All experiments included negative (without DNA) and positive controls (with DNA of strains with known IRS-PCR patterns), which were processed with the samples.

IRS-PCR patterns were analysed by the GelCompar® II version 6.0 software (Applied Maths, Belgium). IRS-PCR fingerprints from the different gels were interpreted via differences in band patterns according to published guidelines (Struelens 1996). Where no differences were found between band patterns, strains were considered identical. Where differences were found in four or more fragments, strains were considered to be separate types. Strains differing in up to three fragments only were considered to be subtypes. A capital letter was used to define a distinct type and a numerical suffix was used to indicate the subtype profile (A1 for example).

SAMPLING OF CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* STRAINS FOR DIVERSITY ANALYSES

The sampling effort necessary to ensure the correct representativeness of the culturable *L. pneumophila* community was validated based on four water samples from two nuclear power plant cooling circuits (electricity production units 3 or 4) located on the Moselle River (site M, Figure 1). Samples were collected in February, March, July and August 2009, and were named M3- or M4-FEB09 to M3- or M4-AUG09. For each sample collected from the cooling circuits' cold basins (Figure 2), between 150 and 200 *L. pneumophila* strains were isolated by the culture method and were identified by the IRS-PCR technique at the subspecies level. Rarefaction curves were constructed based on these data and were used to determine the minimum strain number per sample to be identified to ensure the correct representativeness of the *L. pneumophila* community.

After determining the sampling effort needed for the *L. pneumophila* diversity study, 100 strains from each sample, taken from water collected from the cooling circuits at site L, were isolated when possible and identified using the IRS-PCR method. These isolates were, as a preference, collected from plates inoculated with raw or filtered water without heat or acid treatment.

STATISTICAL ANALYSES

For each sample, the representativeness of the culturable *L. pneumophila* strains was validated by rarefaction curves and by calculating the sample coverage rate for 100 strains. The sample coverage rate is given by the formula defined by Good (1953):

$$\hat{C} = 1 - \frac{S_1}{\sum_{i=1}^s iS_i}$$

where $\hat{C}$ is the sample coverage rate estimator, S_1 is the number of subpopulations observed only once and S_i is the number of subpopulations observed i times in the sample. The diversity indices used for this study were the Chao1 species richness estimator (Chao 1984), the Shannon diversity index (Shannon 1948, Shannon & Weaver 1949) and the Pielou equitability index (Pielou 1975).

Statistical analyses were performed using the non-parametric Multi-Dimensional Scaling (nMDS) test associated with the Bray Curtis index, Principal Component Analysis (PCA) with the Pearson correlation coefficient, and the ANOSIM test based on the Bray Curtis similarity index (see Parthuisot et al., 2010, for explanations). All statistical tests were performed using the Past software, version 2.01 (Hammer et al. 2001).

RESULTS

VALIDATION OF THE SAMPLING EFFORT NECESSARY TO ENSURE THE CORRECT REPRESENTATIVENESS OF THE CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* COMMUNITY

The sampling effort needed to ensure the correct representativeness of the culturable *L. pneumophila* community was determined using rarefaction curves constructed based on the *L. pneumophila* subpopulations' abundance data, isolated from the four water samples from the cold basins of nuclear power plant cooling circuits along the Moselle River (Figure 1). Among these strains, 25 subpopulations were detected in February 2009 and March 2009; 29 were detected in July 2009 and 37 in August 2009.

Rarefaction curves constructed from these data (Figure 3) showed that the identification of 100 strains would be sufficient to not fall within the linear phase of the curves, and would enable the correct comparison of species richness in the samples. Moreover, the sample coverage rate estimators, calculated for the identification of 100 strains, were higher than 0.75 for all four samples: 0.960, 0.930, 0.930 and 0.910 for M3-FEB09, M3-MAR09, M3-JUL09 and M4-AUG09 respectively. This confirmed that the typing of 100 strains per sample was sufficient. As a result, a minimum set of 100 strains was identified for each sample by IRS-PCR, where the culture method made this possible, to determine the diversity and temporal dynamics of the *L. pneumophila* community in cooling circuit water.

COMPOSITION OF THE CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* COMMUNITY

Twelve water samples in total were collected from the cold basins in the cooling circuits at site L (Figure 1). These samples were taken from nuclear power plant units 1 or 2, depending on availability. All were usable in terms of diversity representativeness ($\hat{C} \geq 0.840$). The culturable *L. pneumophila* community consisted of 18 ± 6 subpopulations with different IRS-PCR profiles. Among the strains isolated, a high proportion of serogroup 1 was observed with $85 \pm 12.14\%$ of the *L. pneumophila* belonging to this serotype.

An nMDS analysis based on the Bray Curtis index was performed on the relative abundance of culturable *L. pneumophila* subpopulations (Figure 4), and suggested firstly that the profile compositions from the two units at the power plant were not different. An ANOSIM test (10,000 permutations, based on two groups formed by the relative abundance of subpopulations detected in samples collected from unit 1 or unit 2) was performed to confirm this result. With an R value close to zero ($R = 0.3238$, $p\text{-value} < 0.05$), the test indicated that the compositions of the *L. pneumophila* subpopulations from unit 1 and 2 were not statistically different. This may mean that for cooling units with the same design (material type, condenser, cooling tower structure) the *L. pneumophila* community is related to the make-up water rather than being specific to the cooling unit. Secondly, the composition of the *L. pneumophila* community was marked by seasonality, with four different groups. Autumn was represented by samples L2-MAR10, L1-OCT10, L1-NOV10, L2-FEB11 and L2-MAR11. Samples L1-DEC10 and L2-JAN11 represented the winter season, and L2-MAY10, L2-JUL10, L2-AUG10 and L2-SEPT10 characterised the summer season. L2-APR10 was the only member of the spring season.

PCA showed (Figure 5) that this seasonality related to a limited number of *L. pneumophila* subpopulations (A3, AB8, AB10, AB13, AB21, AB22, G11 and M2), each of which had the particularity of being highly abundant at one time of the year. Indeed, these subpopulations were never less than 10% and could represent more than 50% of the global *L. pneumophila* community. Figure 6 shows the changes in the relative abundance of these subpopulations and provides some explanatory information on composition seasonality. Autumn samples were represented by a high relative abundance of the AB8 subpopulation. In April, the population was composed of three dominant subpopulations, including A3 and AB10, which were more abundant than in other periods of the year. The summer season was characterised by a gradual increase in the AB13 subpopulation, which appeared in April and decreased from October, when AB8 was dominant. In winter, AB8 was no longer dominant and the subpopulation AB22 represented a high proportion. In summer and winter, the subpopulations that appeared to be responsible for community composition seasonality, *i.e.* AB13 and AB22, were directly related to seasonal factors: air temperature (from 5.10°C in

winter to 22.90°C in summer), water temperature (from 14.80°C in winter to 27.80°C in summer) and amounts of nitrate (from 8.40 mg.l⁻¹ in summer to 20.00 mg.l⁻¹ in winter) (data not shown). Conversely, subpopulations related to the autumn and spring seasons seemed to be unaffected by these factors. One hypothesis from these results is that when seasonal parameters are high or low, such as in summer and winter, subpopulations sensitive to these factors influence the community composition, whereas when seasonal parameters are mild, such as in autumn and spring, the community composition is influenced by subpopulations which are not sensitive to these factors.

DIVERSITY OF THE CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* COMMUNITY

During the studied period, the culturable *L. pneumophila* community presented a high degree of diversity (Table 1). The average estimated subpopulation richness was 30 ± 14 subtypes with a high annual coefficient of variation of 46.43%. While community richness was seen to be highly changeable, the diversity and the equitability of the community were relatively stable (the Shannon and Pielou indices showed an annual coefficient of variation of 19 and 10.44% respectively). Thus, despite the high changeability of the number of subpopulations, community structures were stable with, on average, $45 \pm 12\%$ of the community composed of minority subpopulations (<10%) and the remaining 55% composed of majority subpopulations ($\geq 10\%$). Correlation tests based on Pearson's coefficient were performed with the aim of linking diversity characteristics with environmental parameters and the presence and relative abundance of subpopulations.

Diversity indices were not linked to either physicochemical or microbiological parameters. These tests showed a negative link between the A3 subpopulation and the Chao1 and Shannon indices ($r_p = -0.628$ between A3 and the Chao1 index; $r_p = -0.710$ between A3 and the Shannon index, with $p\text{-values} < 0.05$ for both tests). Pielou's equitability index was negatively linked with the AB8 subpopulation ($r_p = -0.689$, $p\text{-value} < 0.05$). All of these diversity parameters were also positively linked with the cumulative abundance of the population known as "Background Noise" ("BgN"): $r_p = 0.767$, 0.901 and 0.656 between BgN relative abundance and the Chao1, Shannon and Pielou indices respectively (all tests showed a $p\text{-value}$ of less than 0.05). The BgN population corresponds to the set of subpopulations whose relative abundance per subpopulation never exceeds 10% during the studied year. All of these results could mean that the A3 subpopulation interacts negatively with all of the other subpopulations, by reducing their richness but not their relative abundance. Conversely, the AB8 subpopulation interacts negatively with all the other subpopulations by reducing their relative abundance but not the number of subpopulations. Thus, the subpopulation richness and the structure of the culturable *L. pneumophila* community would be regulated by interactions between all the subpopulations with A3 and AB8, which are not linked to environmental factors (physicochemical and microbiological parameters).

COMPOSITION AND DIVERSITY EFFECTS OF THE CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* COMMUNITY ON TOTAL *LEGIONELLA* CONCENTRATIONS

The aim of this analysis was first to identify factors (physicochemical, microbiological and *L. pneumophila* community structural factors) which could have an effect on the amounts of culturable *L. pneumophila* observed in cooling circuits, and second, to provide information to aid our understanding of the concentration variations.

The concentrations of culturable *L. pneumophila* were significantly different between units 1 and 2 (Mann-Whitney U test, *p-value* <0.05), meaning that the degrees of contamination for the two units were not comparable, even though their composition was analogous. Therefore, to avoid bias and to maintain a maximum number of samples, the analysis was performed only on unit 2. The cooling circuit of unit 2 was slightly contaminated (from 8.67×10^2 to 9.20×10^3 CFU.l⁻¹) and concentrations showed a variation of 1.02 log units only.

The analysis was performed using PCA and correlation tests based on Pearson's coefficient. It showed firstly that the culturable *L. pneumophila* concentration was not linked with the diversity and structure of the community. Direct and indirect links with the *L. pneumophila* concentration were highlighted by statistical tests. As summarised in Figure 7, seasonal factors, represented by sunshine duration, air and water temperatures, and amounts of nitrate, were significantly linked with *L. pneumophila* concentrations. Amounts of *Pseudomonas* were also directly associated with *L. pneumophila* concentrations, suggesting that *Pseudomonas* may be sensitive to the same environmental factors, or that a positive biological interaction occurs between these two bacterial populations. A limited number of subpopulations showed a significant link between their absolute abundance (corresponding to the product of relative subpopulation abundance with the *L. pneumophila* concentration) and the *L. pneumophila* concentrations. However, the BgN population showed a positive link with *L. pneumophila* concentrations, indicating that these were mostly influenced by the minority subpopulations whose relative abundance never exceeded 10% during the studied year, and were slightly influenced by the abundant subpopulations.

The PCA (not shown) confirmed these results and highlighted other factors indirectly related to the observed *L. pneumophila* concentrations, as shown schematically in Figure 8. These factors, such as the total amounts of bacteria and amoebae, or the Chlorophyll a and dissolved oxygen concentrations, were linked to the *L. pneumophila* concentrations through their relation with subpopulations directly associated with the *L. pneumophila* concentrations. In addition to providing decisive information on *L. pneumophila* concentrations, these results suggest that culturable *L. pneumophila* concentrations are probably regulated by strain-specific interactions between the environment and some subpopulations.

DISCUSSION

To our knowledge, this study is one of the first dealing with the diversity and dynamics of *L. pneumophila* subpopulations in nuclear power plant cooling circuits. A particular sampling strategy and an original analysis method have been developed to improve our knowledge of *L. pneumophila* ecology and to aid our understanding of the variations in culturable *L. pneumophila* concentrations in cooling circuits.

This study involved monitoring the temporal dynamics of culturable *L. pneumophila* in cooling circuits and allowed us to formulate several hypotheses, which had to be thorough, on their ecology. Firstly, the study shows that, even if colonisation rates between power plant units are significantly different, the *L. pneumophila* communities at the two units studied here appear to have a similar composition. The composition of the culturable *L. pneumophila* community seems not to be unit-specific and could depend on the make-up water. However, certain other parameters must be considered, such as the type and design

of the different units. In our case, the two units studied were identical in terms of the construction date, constitutive material and working processes. This hypothesis is consistent with that of Ragull et al. (2007) who, through the analysis of *L. pneumophila* subpopulations by PFGE typing, showed that the same profiles were shared by different cooling towers, supplied by the same network, and persisted over time. Their hypothesis is that in different cooling towers, supplied by the same make-up water and exhibiting the same design and the same mode of operating, the environmental pressures are similar and lead to the same adaptation response. These cumulative and identical factors would increase the probability of finding similar subpopulations.

A simple way to confirm this hypothesis would be to sample the cooling circuits at both units simultaneously and to compare their compositions with the composition of *L. pneumophila* in the make-up water. However, technical improvements would be required to identify enough *L. pneumophila* bacteria in the make-up water, because most of the time the concentrations upstream from the cooling circuits are below the detection threshold for the standardised method.

Culturable *L. pneumophila* dynamics showed a seasonal change during the year of study. This seasonality seemed to be regulated by a limited number of subpopulations and to respond to seasonal factors that would influence different subpopulations during cold or warm seasonal periods. Previous studies have already shown the effects of seasonal factors on *Legionella* concentrations in different environments (Bentham & Broadbent 1993, Rivera et al. 2007, Marciano et al. 2010). These seasonal effects have also been implicated in temporal diversity changes in the *Legionella* community (Turetgen et al. 2005, Parthuisot et al. 2010). All of these results highlight the effects of seasonal parameters on *Legionella* distribution. These may be due to a *Legionella* strain-specific temperature sensitivity (Sheehan et al. 2005, Buse & Ashbolt 2011) or, indirectly, to a temperature-dependent relationship with amoebae or other microorganisms, as already mentioned in different studies, which may regulate the relative abundance of *Legionella* subpopulations (Rohr et al. 1998, Ohno et al. 2008, Marciano et al. 2010).

Culturable *L. pneumophila* subpopulations involved in seasonal changes to the community composition, including A3 and AB8, are also involved in the degree of diversity and structure of the community. Negative links have been identified between these two dominant subpopulations and the pool of minority subpopulations, indicating that the degree of diversity and the community structure may be regulated by the negative interactions between dominant and minority subpopulations, without links to environmental factors. Supplementary experiments must be performed to answer the question of whether diversity and community structure depend on intra-community regulatory mechanisms or unmeasured biotic / abiotic factors.

In this study, *L. pneumophila* concentrations determined by culture were not linked to diversity parameters. Concentrations seemed to be directly regulated by seasonal factors and by the presence and abundance of *Pseudomonas*. Interactions between *Legionella* and *Pseudomonas* bacteria were already known to occur. *Pseudomonas* is usually found as an inhibitor of the proliferation of *Legionella* by secretion of a bacteriocin-like substance (Declerck et al. 2005, Guerrieri et al. 2008). Nevertheless, depending on environmental conditions, *Pseudomonas* could also promote the proliferation of *Legionella* bacteria as demonstrated by Guerrieri et al. (2007) who showed that in cold water, *Pseudomonas* permits *Legionella* survival.

Other parameters were indirectly linked with the *L. pneumophila* concentrations in the cooling circuits at the nuclear power plants studied. These environmental factors were directly linked with some *L. pneumophila* subpopulations which, in turn, were directly linked with the concentrations. The results seem to indicate that strain-specific interactions with biotic factors, and strain-specific sensitivities to abiotic factors, are the main factors to aid a better understanding of the variations in the *L. pneumophila* concentrations observed. Some elements already known support this hypothesis and deserve to be studied thoroughly. The strain-specific interaction between *Amoebae* and *Legionella* for their proliferation and survival is one of the best examples (Fields et al. 1990, Neumeister et al. 1997).

The present study has increased our knowledge of the ecology of *L. pneumophila* in water from nuclear power plant cooling circuits, by showing the fine regulatory mechanisms of the *L. pneumophila* community. It also strongly encourages us to test various hypotheses derived from our laboratory experiments. Performing metagenomic analyses, and screening the temporal dynamics of the *Legionella* genus (culturable and non-culturable), total bacteria and protozoa phylum, would be useful to complete our vision of the biotic interactions between *Legionella* and other microorganisms. However, to date, the characteristics of the water flowing through nuclear power plant cooling circuits make it difficult to undertake an analysis that targets the *Legionella* genus without prior culture. Such a study would require technical improvements to control the extraction and amplification of *Legionella* DNA directly from raw water and to ensure the correct representativeness of the diversity measured.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Electricité De France (EDF) and from the National Association for Research and Technology (ANRT), which are linked together by an industrial research training contract (CIFRE).

Emilie Lehericey (EDF R&D) and Gaëlle Le-Meur (Ajilon Engineering) are particularly acknowledged for their contribution to the sampling campaigns and laboratory tests. We also thank our nuclear power plant partner, Guy Perrichon (EDF), who provided access to the plant and allowed the completion of this study.

LITERATURE CITED

- Allard KA, Dao J, Sanjeevaiah P, McCoy-Simandle K, Chatfield CH, Crumrine DS, Castignetti D, Cianciotto NP (2009) Purification of legiobactin and importance of this siderophore in lung infection by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 77:2887-2895
- Association Française de Normalisation (2006) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila*: Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. NF T90-431.
- Bargellini A, Marchesi I, Righi E, Ferrari A, Cencetti S, Borella P, Rovesti S (2011) Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Res* 45:2315-2321

- Bentham RH, Broadbent CR (1993) A model for autumn outbreaks of Legionnaires' disease associated with cooling towers, linked to system operation and size. *Epidemiol Infect* 111:287-295
- Berk SG, Gunderson JH, Newsome AL, Farone AL, Hayes BJ, Redding KS, Uddin N, Williams EL, Johnson RA, Farsian M, Reid A, Skimmyhorn J, Farone MB (2006) Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ Sci Technol* 40:7440-7444
- Bonnell JA, Rippon JE (1985) *Legionella* in power station cooling waters. *The Lancet* 2:327-328
- Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, Neglia R, Marchesi I, Fantuzzi G, Tatò D, Napoli C, Quaranta G, Laurenti P, Leoni E, De Luca G, Ossi C, Moro M, Ribera D'Alcalà G (2004) *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis* 10:457-464
- Buse HY, Ashbolt NJ (2011) Differential growth of *Legionella pneumophila* strains within a range of amoebae at various temperatures associated with in-premise plumbing. *Lett Appl Microbiol* 53:217-224
- Campese C, Maine C, Che D (2010) Les cas de légionellose déclarés en France en 2009. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 31-32:334-335
- Carducci A, Verani M, Battistini R (2010) *Legionella* in industrial cooling towers: monitoring and control strategies. *Lett Appl Microbiol* 50:24-29
- Carvalho FR, Nastasi FR, Gamba RC, Foronda AS, Pellizari VH (2006) Diversity of *Legionella* spp. in Antarctic lakes of the Keller Peninsula. In: *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. ASM Press
- Carvalho FR, Nastasi FR, Gamba RC, Foronda AS, Pellizari VH (2008) Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Curr Microbiol* 57:294-300
- Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11:265-270
- Che D, Campese C, Jarraud S (2009) Légionelles et légionellose : qu'a-t-on découvert depuis 30 ans ? *Pathologie Biologie* 59:134-136
- Cooper IR, Hanlon GW (2010) Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect* 74:152-159
- Declerck P (2009) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 9999
- Declerck P, Behets J, Delaedt Y, Margineanu A, Lammertyn E, Ollevier F (2005) Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microb Ecol* 50:536-549
- Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F (2007) Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res* 41:3159-3167

- Deubner DC, MacCormack JN, Kleeman K, Muhlbaier LH (1986) One-time screening to define the problem: *Legionella* exposure in an electric power company. J Occup Med 28:670-673
- Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M (2008) A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *legionellae* that can recover their cultivability. Appl Environ Microbiol 74:4817-4824
- Fields BS, Barbaree JM, Sanden GN, Morrill WE (1990) Virulence of a *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. Infect Immun 58:3139-3142
- Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C (2009) *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. Infect Genet Evol 9:727-739
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biometrika 40:237-264
- Guerrieri E, Bondi M, Borella P, Messi P (2007) Influence of aquatic microorganisms on *Legionella pneumophila* survival. New Microbiologica 30:247-251
- Guerrieri E, Bondi M, Sabia C, de Niederhausern S, Borella P, Messi P (2008) Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. Curr Microbiol 57:532-536
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4:4-9
- Harf C, Monteil H (1988) Interactions between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. Water Sci Technol 20:235
- Jakubek D, Le Brun M, Leblon G, DuBow M, Binet M (in press) Validation of IRS PCR, a molecular typing method, for the study of the diversity and population dynamics of *Legionella* in industrial cooling circuits. Lett Appl Microbiol
- Marciano-Cabral F, Jamerson M, Kaneshiro, ES (2010) Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. J Water Health 8:71-82
- Mathys W, Stanke J, Harmuth M, Junge-Mathys E (2008) Occurrence of *Legionella* in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating. Int J Hyg Environ Health 211:179-185
- Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT (1996) DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. J Clin Microbiol 34:2386-2390
- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Appl Environ Microbiol 71:20-28
- Moore MR, Pryor M, Fields B, Lucas C, Phelan M, Besser RE (2006) Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp. Appl Environ Microbiol 72:378-383
- Morton S, Bartlett CL, Bibby LF, Hutchinson DN, Dyer JV, Dennis PJ (1986) Outbreak of legionnaires' disease from a cooling water system in a power station. Br J Ind Med 43:630-635

- Neumeister B, Schöniger S, Faigle M, Eichner M, Dietz K (1997) Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol 63:1219-1224
- Ohno A, Kato N, Sakamoto R, Kimura S, Yamaguchi K (2008) Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). Appl Environ Microbiol 74:4585-4588
- Parthuisot N, West NJ, Lebaron P, Baudart J (2010) High diversity and abundance of *Legionella* spp. in a pristine river and impact of seasonal and anthropogenic effects. Appl Environ Microbiol 76:8201-8210
- Pielou EC (1975) Ecological diversity, Vol. Wiley
- Pougnaud C, Catala P, Drocourt J-L, Legastelois S, Pernin P, Pringuez E, Lebaron P (2002) Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. Appl Environ Microbiol 68:3102-3107
- Ragull S, Garcia-Nunez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Esteve M, Montenegro R, Sabria M (2007) *Legionella pneumophila* in cooling towers: fluctuations in counts, determination of genetic variability by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and persistence of PFGE patterns. Appl Environ Microbiol 73:5382-5384
- Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J (1998) Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol 36:161-167
- Rivera JM, Aguilar L, Granizo JJ, Vos-Arenilla A, Giménez MJ, Aguiar JM, Prieto J (2007) Isolation of *Legionella* species/serogroups from water cooling systems compared with potable water systems in Spanish healthcare facilities. J Hosp Infect 67:360-366
- Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, 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. Appl Environ Microbiol 64:1822-1824
- Sabria M, Garcia-Nunez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Gimeno JM, Reynaga E, Morera J, Rey-Joly C (2001) Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. Infect Control Hosp Epidemiol 22:673-676
- Sanchez I, Garcia-Nunez M, Ragull S, Sopena N, Pedro-Botet ML, Rey-Joly C, Sabria M, Esteve M (2008) Genotypic variability and persistence of *Legionella pneumophila* PFGE patterns in 34 cooling towers from two different areas. Environ Microbiol 10:395-399
- Schoen ME, Ashbolt NJ (2011) An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events. Water Res 45:5826-5836
- Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. The bell system technical journal 27:379-423, 623-656
- Shannon CE, Weaver W (1949) The Mathematical Theory of Communication, Vol. University of Illinois Press
- Sheehan KB, Henson JM, Ferris MJ (2005) *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. Appl Environ Microbiol 71:507-511

- Stojek N, Dutkiewicz J (2006) *Legionella* and other gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban sources. *Ann Agric Environ Med* 13:323-335
- Stout JE, Yu VL, Best MG (1985) Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 49:221-228
- Stout JE, Yu VL, Yee YC, Vaccarello S, Diven W, Lee TC (1992) *Legionella pneumophila* in residential water supplies: environmental surveillance with clinical assessment for Legionnaires' disease. *Epidemiol Infect* 109:49-57
- Struelens MJ (1996) Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 2:2-11
- Turetgen I, Sungur E, Cotuk A (2005) Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems. *Environ Monit Assess* 100:53-58
- Verissimo A, Marrao G, da Silva FG, da Costa MS (1991) Distribution of *Legionella spp.* in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of Sao Miguel, Azores. *Appl Environ Microbiol* 57:2921-2927
- Werner HP (1987) Presence and significance of *Legionella* in power station cooling systems. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg* 72:147-153
- Wullings BA, Bakker G, van der Kooij D (2011) Concentration and diversity of uncultured *Legionella spp.* in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. *Appl Environ Microbiol* 77:634-641
- Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T (1996) Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiol Ecol* 20:149-154
- Yamamoto H, Sugiura M, Kusunoki S, Ezaki T, Ikeda M, Yabuuchi E (1992) Factors stimulating propagation of *Legionellae* in cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 58:1394-1397

FIGURE LEGENDS

- FIGURE 1: Study sites located on the Loire River (Site L) and the Moselle River (Site M).
- FIGURE 2: Sampling point located in the cold basin of the nuclear power plant cooling circuit, upstream from the recirculating water pumps, where the water is mixed to the greatest degree.
- FIGURE 3: Rarefaction curves for culturable *L. pneumophila* subpopulations identified by IRS-PCR typing, taken from samples collected at site M.
- FIGURE 4: nMDS analysis, based on the Bray Curtis index (Kruskal stress = 0.1586), of *L. pneumophila* community composition in samples collected over one year from the unit 1 (■) and unit 2 (●) cooling circuits at the nuclear power plant at site L.
- FIGURE 5: PCA biplot showing culturable *L. pneumophila* subpopulations identified by IRS-PCR. Symbols represent the seasonal clusters constructed from the nMDS analysis, based on the composition of the culturable *L. pneumophila* community (● for autumn samples, ▲ for winter samples, ■ for summer samples and ◆ for the spring sample). Separation on the F1 axis represents 45.95% of the variance and is caused by subpopulations AB13 and AB8. On the F2 axis, the separation is

caused by subpopulations A3, AB13, AB8, AB21, AB22 and G11 and represents 18.89% of the variance. Separation on the F3 axis is caused by subpopulations A3, AB10, AB13, AB21, AB8, G11 and M and represents 14.90% of the variance.

FIGURE 6: Relative abundance of subpopulations of interest which are linked to the seasonality of community compositions.

FIGURE 7: Relationship between culturable *L. pneumophila* concentration and different parameters which present a significant Pearson correlation coefficient. Solid lines represent 95% confidence.

FIGURE 8: Schematic representation of significant direct or indirect links existing between culturable *L. pneumophila* concentration and biotic or abiotic factors.

TABLE 1

Diversity indices and their confidence intervals for culturable *L. pneumophila* communities collected from the cold basin at a nuclear power plant located on the Loire.

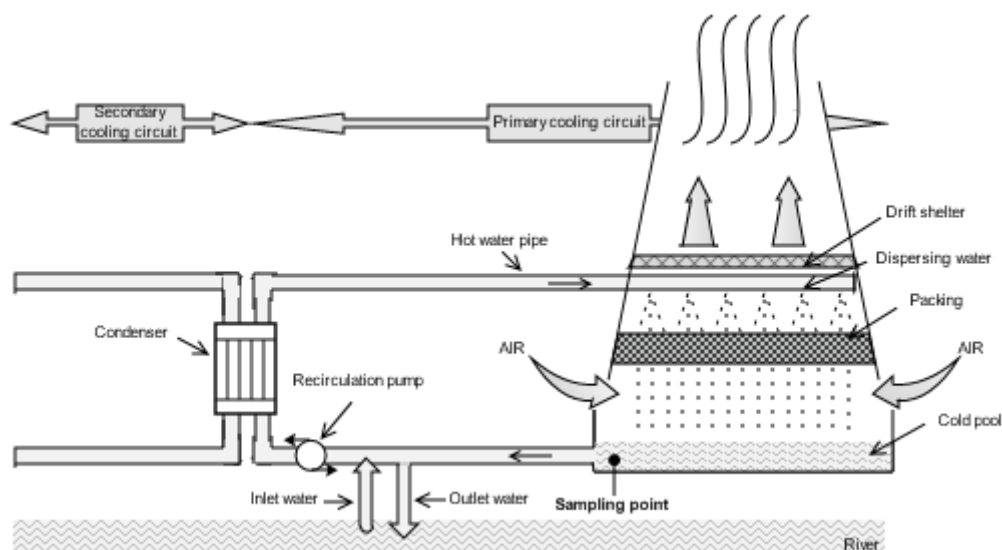
Sampling date	Power plant unit	$\hat{C}$	Number of strains typed	Chao1	Shannon H	Pielou J
3/29/2010	2	0.991	106	8.30 [8.00 ; 12.70] _{IC95%}	1.293 [1.052 ; 1.446] _{IC95%}	0.6220 [0.5417 ; 0.7237] _{IC95%}
4/19/2010	2	0.963	82	15.50 [14.10 ; 29.10] _{IC95%}	2.309 [2.057 ; 2.373] _{IC95%}	0.8748 [0.8248 ; 0.9255] _{IC95%}
5/31/2010	2	0.920	112	41.00 [27.00 ; 104.30] _{IC95%}	2.703 [2.423 ; 2.739] _{IC95%}	0.8621 [0.8375 ; 0.9123] _{IC95%}
7/5/2010	2	0.920	100	28.00 [22.50 ; 54.70] _{IC95%}	2.469 [2.140 ; 2.558] _{IC95%}	0.8110 [0.7666 ; 0.8770] _{IC95%}
8/2/2010	2	1.000	103	12.00 [12.00 ; 12.00] _{IC95%}	1.886 [1.592 ; 2.051] _{IC95%}	0.7590 [0.6598 ; 0.8312] _{IC95%}
9/8/2010	2	0.874	95	43.00 [26.60 ; 107.70] _{IC95%}	2.101 [1.678 ; 2.249] _{IC95%}	0.6900 [0.6256 ; 0.7856] _{IC95%}
10/18/2010	1	0.910	111	34.00 [22.50 ; 83.20] _{IC95%}	2.158 [1.846 ; 2.289] _{IC95%}	0.7327 [0.7055 ; 0.8193] _{IC95%}
11/15/2010	1	0.902	102	30.30 [21.70 ; 66.70] _{IC95%}	1.969 [1.608 ; 2.103] _{IC95%}	0.6686 [0.6229 ; 0.7627] _{IC95%}
12/13/2010	1	0.965	113	17.00 [15.20 ; 31.00] _{IC95%}	2.192 [1.956 ; 2.288] _{IC95%}	0.8095 [0.7667 ; 0.8757] _{IC95%}
1/17/2011	2	0.840	94	51.00 [36.10 ; 102.70] _{IC95%}	2.929 [2.533 ; 2.957] _{IC95%}	0.8611 [0.8251 ; 0.9107] _{IC95%}
2/14/2011	2	0.899	109	36.00 [27.70 ; 69.10] _{IC95%}	2.495 [2.125 ; 2.589] _{IC95%}	0.7751 [0.7248 ; 0.8462] _{IC95%}
3/14/2011	2	0.891	110	42.50 [30.30 ; 89.90] _{IC95%}	2.525 [2.161 ; 2.635] _{IC95%}	0.7751 [0.7278 ; 0.8483] _{IC95%}
Annual coefficient of variation (CV%)				46.43%	19.00%	10.44%

FIGURE 1



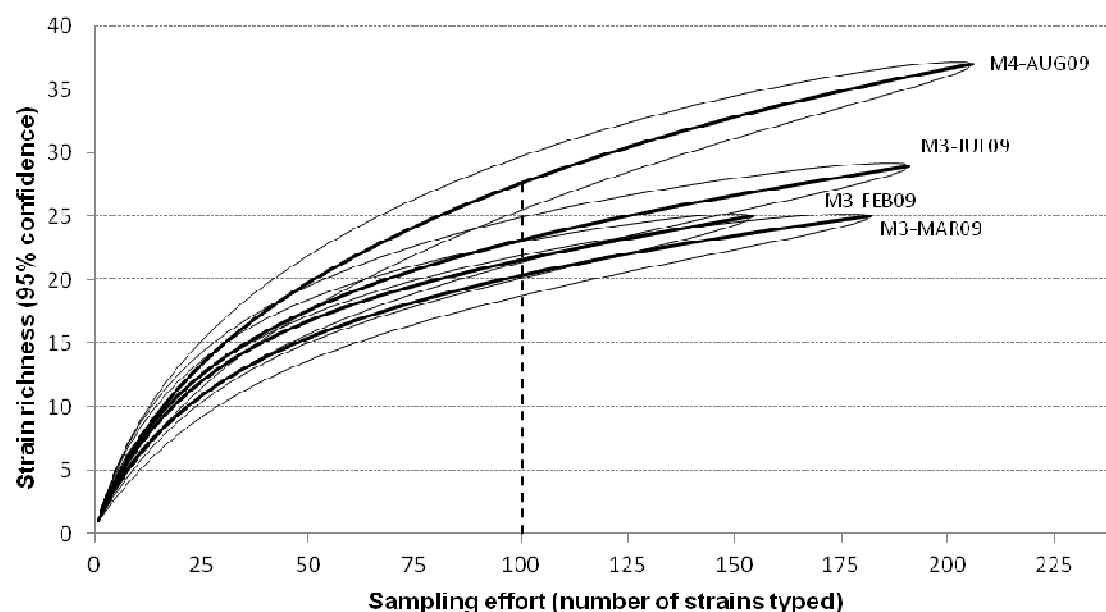
Study sites located on the Loire River (Site L) and the Moselle River (Site M).

FIGURE 2



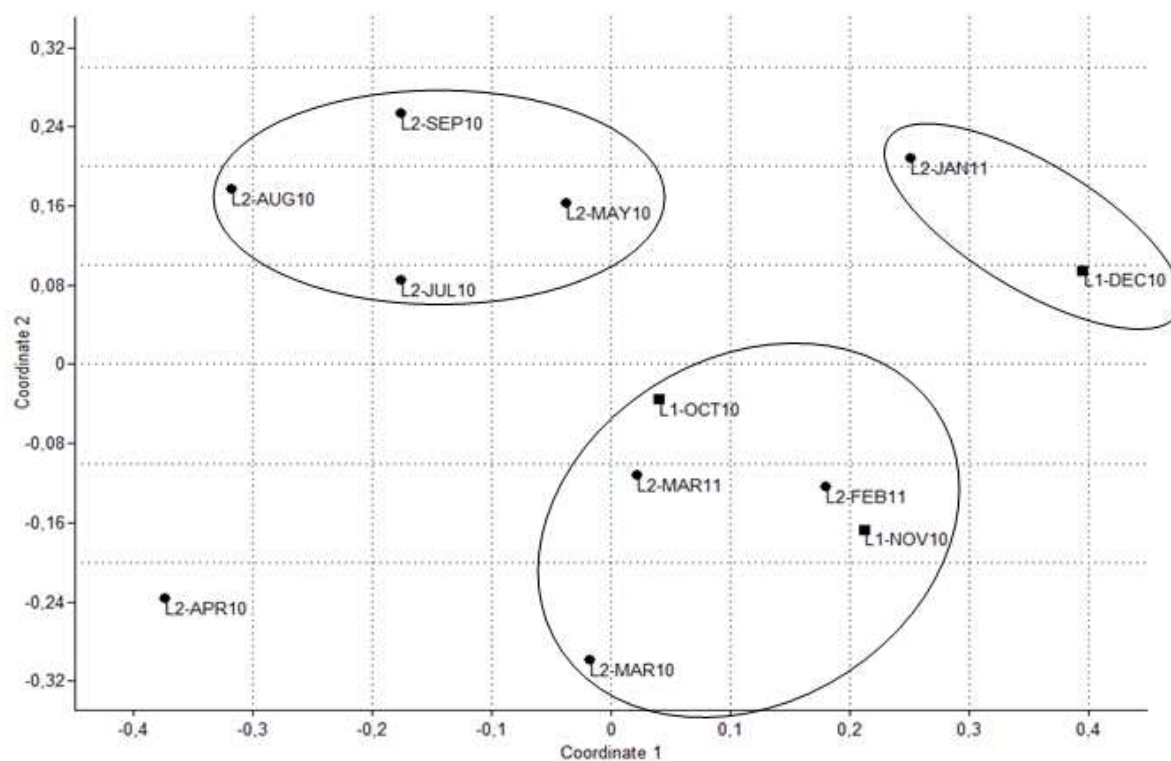
Sampling point located in the cold basin of the nuclear power plant cooling circuit, upstream from the recirculating water pumps, where the water is mixed to the greatest degree.

FIGURE 3



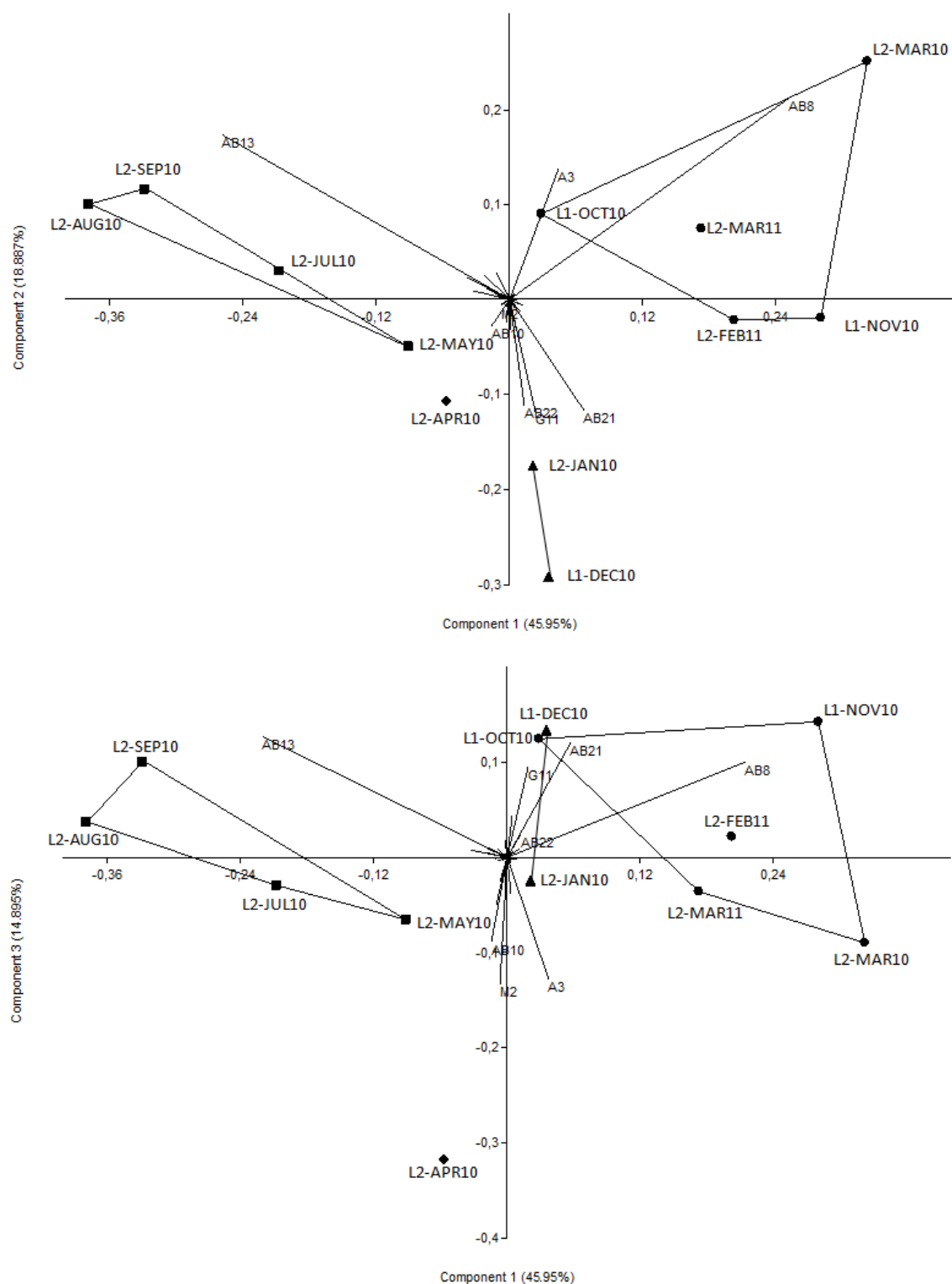
Rarefaction curves for culturable *L. pneumophila* subpopulations identified by IRS-PCR typing, taken from samples collected at site M.

FIGURE 4



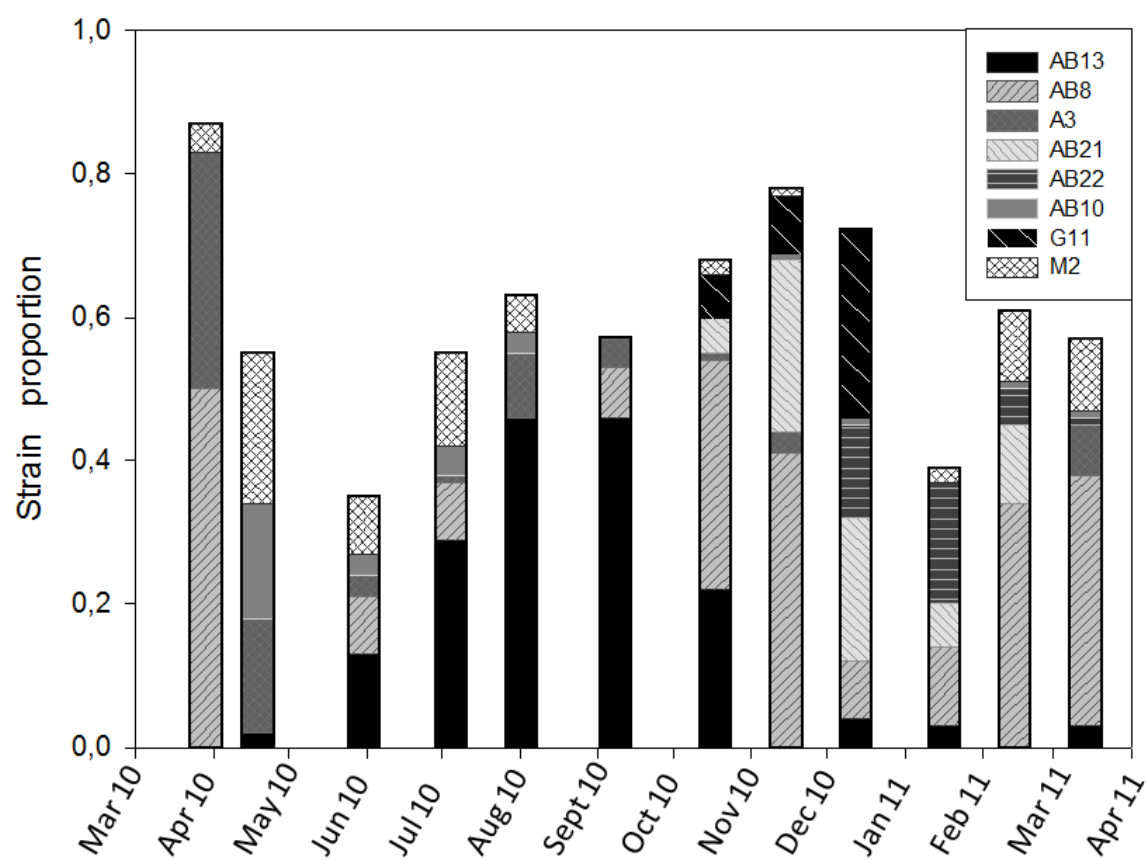
nMDS analysis, based on the Bray-Curtis index (Kruskal stress = 0.1586), of *L. pneumophila* community composition in samples collected over one year from the unit 1 (■) and unit 2 (●) cooling circuits at the nuclear power plant at site L.

FIGURE 5



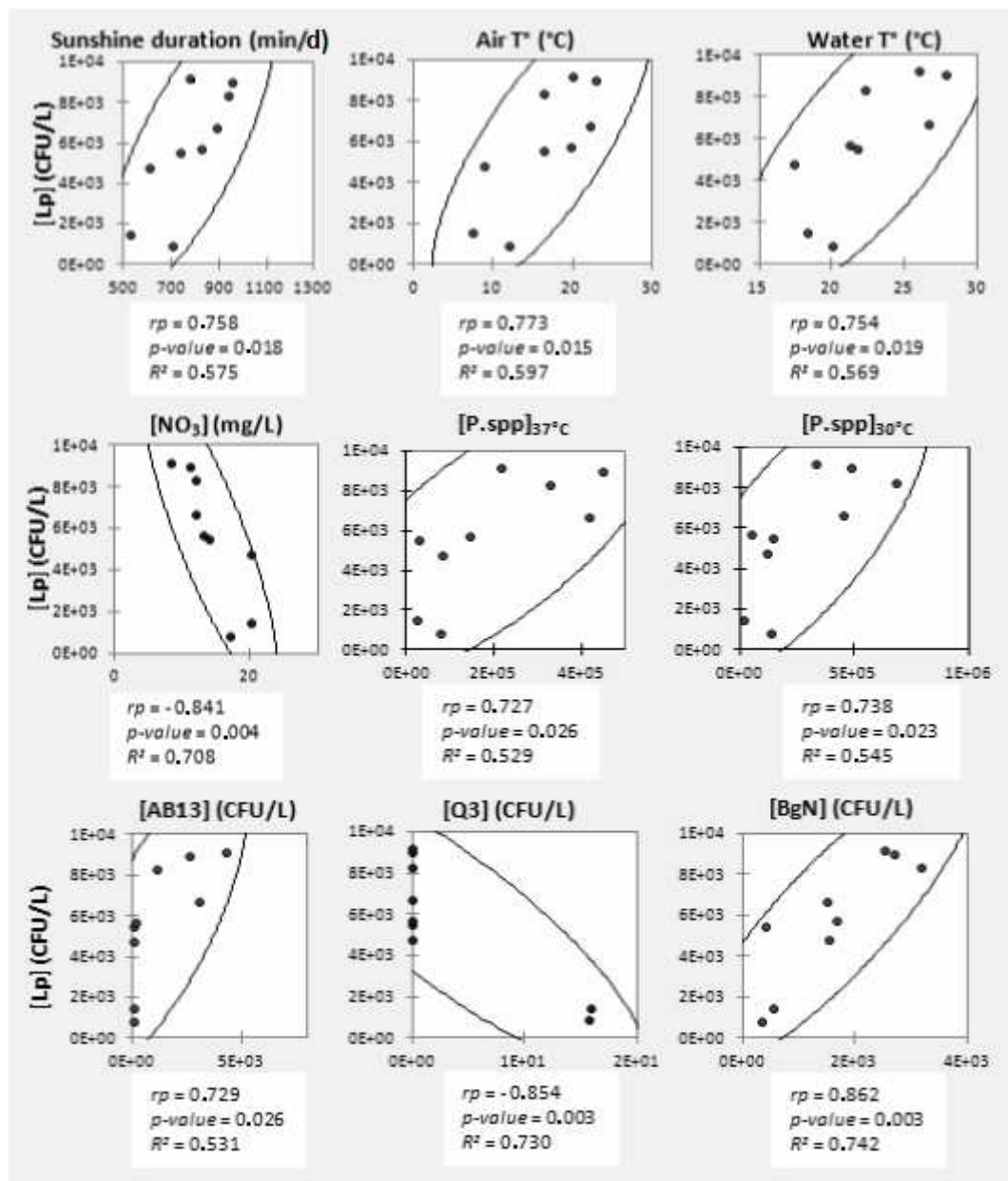
PCA biplot showing culturable *L. pneumophila* subpopulations identified by IRS-PCR. Symbols represent the seasonal clusters constructed from the nMDS analysis, based on the composition of the culturable *L. pneumophila* community (● for autumn samples, ▲ for winter samples, ■ for summer samples and ◆ for the spring sample). Separation on the F1 axis represents 45.95% of the variance and is caused by subpopulations AB13 and AB8. On the F2 axis, the separation is caused by subpopulations A3, AB13, AB8, AB21, AB22 and G11 and represents 18.89% of the variance. Separation on the F3 axis is caused by subpopulations A3, AB10, AB13, AB21, AB8, G11 and M and represents 14.90% of the variance.

FIGURE 6



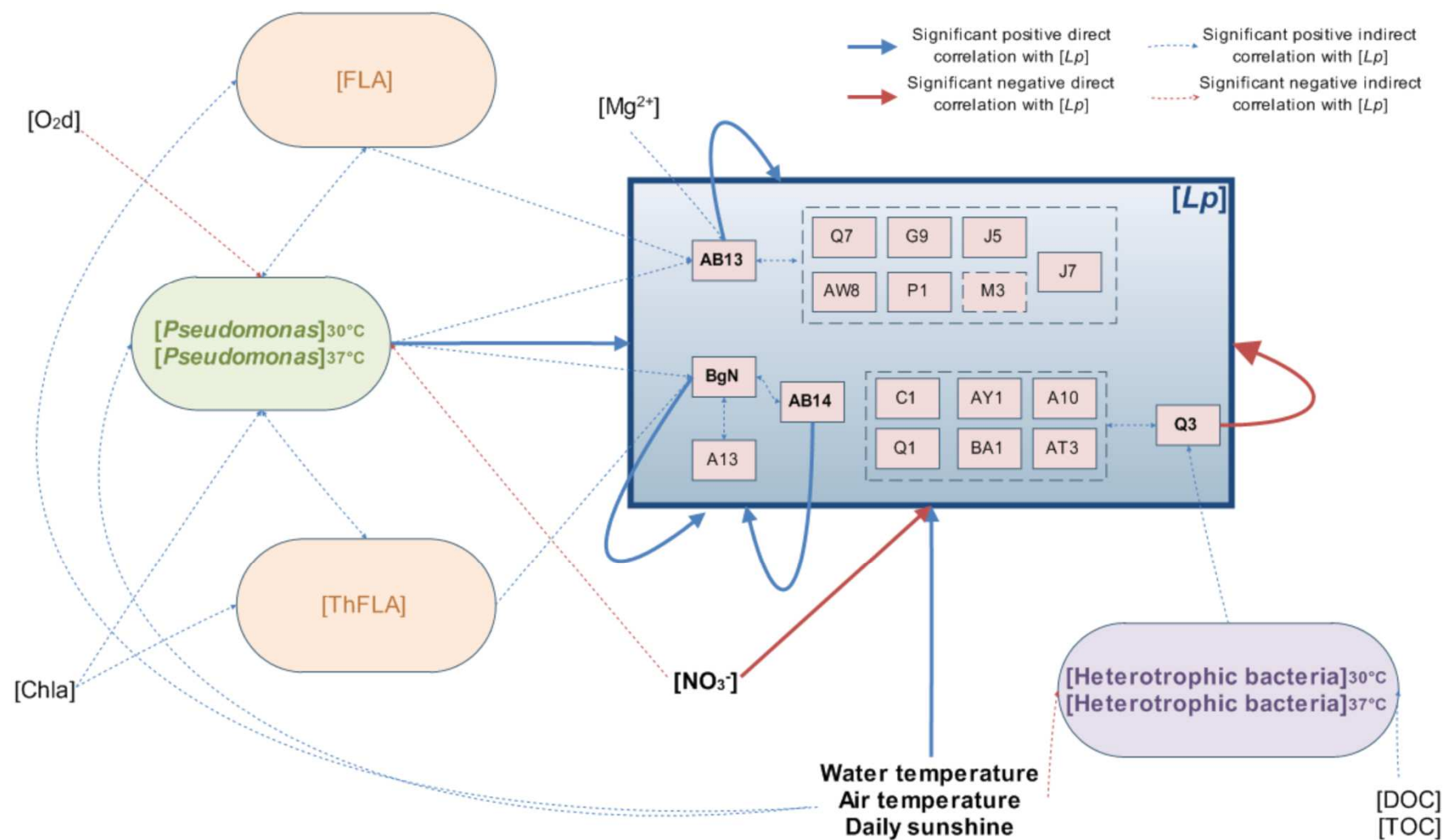
Relative abundance of subpopulations of interest which are linked to the seasonality of community compositions.

FIGURE 7



Relationship between culturable *L. pneumophila* concentration and different parameters which present a significant Pearson correlation coefficient. Solid lines represent 95% confidence.

FIGURE 8



Schematic representation of significant direct or indirect links existing between culturable *L. pneumophila* concentration and biotic or abiotic factors.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

L'analyse des communautés de légionelles naturellement présentes dans les CRF non traités a été réalisée à la fois dans le CNPE de Belleville, mais aussi dans le CNPE de Dampierre.

La communauté de *L. pneumophila* présente dans le CRF de la tranche 4 du CNPE de Dampierre est également composée par un nombre important de sous-populations. Au total, 66 sous-populations ont été détectées sur l'année étudiée avec une moyenne de 20 ± 5 sous-populations par prélèvement (Figure 2-45). Ces sous-populations appartiennent toutes à l'espèce *L. pneumophila*.

Comme pour la communauté de légionelles présente dans les CRF de Belleville, à Dampierre, la richesse spécifique de la communauté de *L. pneumophila* présente un coefficient de variation annuel élevé, de 33.90%, caractérisant une forte évolution annuelle du nombre de sous-populations présentes dans les CRF. Inversement, la structure de la communauté apparaît stable avec l'indice de Shannon qui présente un coefficient de variation annuel de 15.92% et l'indice de Piélou qui évolue avec un coefficient de variation annuel de 8.99%. Ainsi, bien que le nombre de sous-population évolue fortement au cours de l'année, la structure de la communauté reste stable avec $39.39 \pm 12\%$ des sous-populations présentant une abondance inférieure à 10% et $60.61 \pm 12\%$ des sous-populations qui sont majoritaires dans la communauté. L'ensemble des sous-populations minoritaires compose un groupe qui peut représenter jusqu'à 58.82% de la communauté. La communauté de *L. pneumophila* peut également présenter une forte dominance où certaines sous-populations représentent jusqu'à 49.47% de l'ensemble de la communauté (par exemple, la sous-population AW8 en Mars 2011).

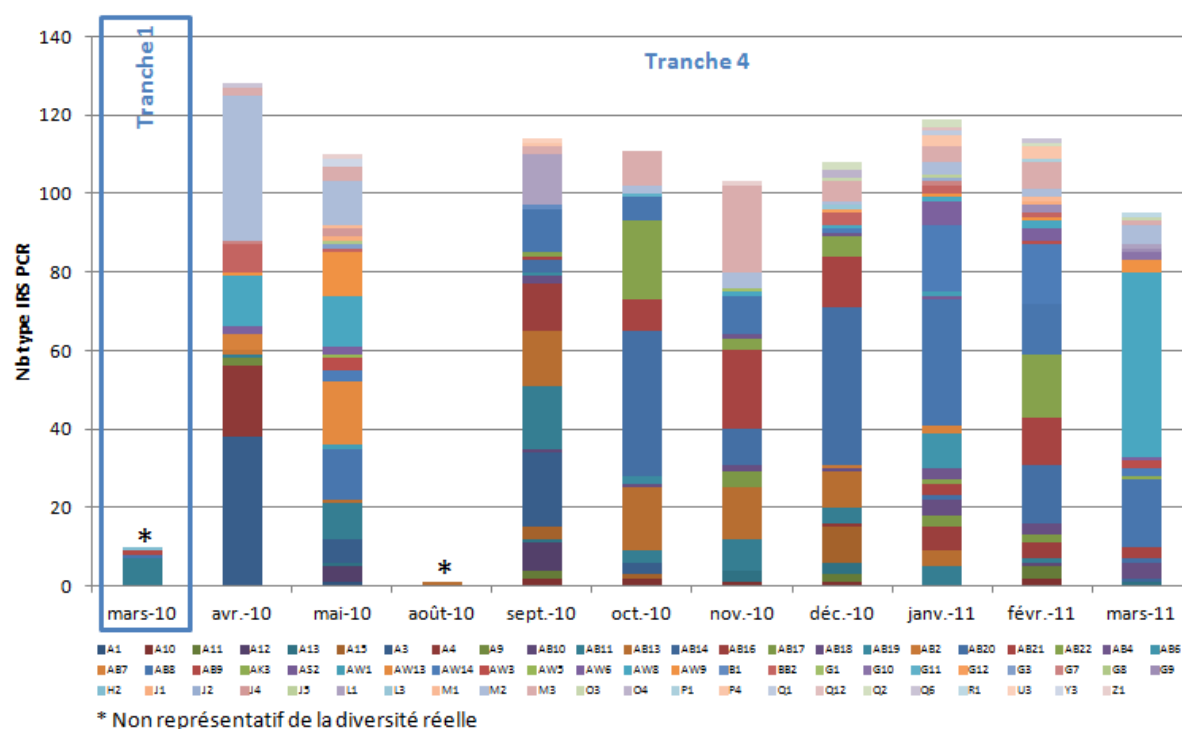


Figure 2-45 : Sous-populations détectées dans les CRF du CNPE de Dampierre.

Des analyses ACP ont permis de décrire des mécanismes hypothétiques de régulation de la communauté de *L. pneumophila* dans le CRF de Dampierre. Ces analyses ont mis en évidence un lien positif entre l'évolution de la proportion de la sous-population AW8 avec le degré d'équitabilité des sous-populations (indice de Piélou) mais aucun lien avec la richesse spécifique ni le degré de diversité. De même, le nombre de sous-populations minoritaires est lié positivement avec l'évolution de la concentration en bactéries hétérotrophes. Ainsi, comme présenté dans la Figure 2-46, la sous-population AW8 régulerait l'abondance cumulée de toutes les autres sous-populations. Cette sous-population ne présente aucun lien avec les paramètres environnementaux mesurés. En parallèle de ce mécanisme intra-communautaire de régulation de l'abondance des sous-populations et de la dominance de la sous-population AW8, la quantité en bactéries hétérotrophes influence le degré de richesse de la communauté de *L. pneumophila*. La concentration en bactéries hétérotrophes est elle-même corrélée à la teneur en matières en suspension, qui pourrait donc avoir une influence indirecte sur la richesse spécifique de la communauté de *L. pneumophila*.

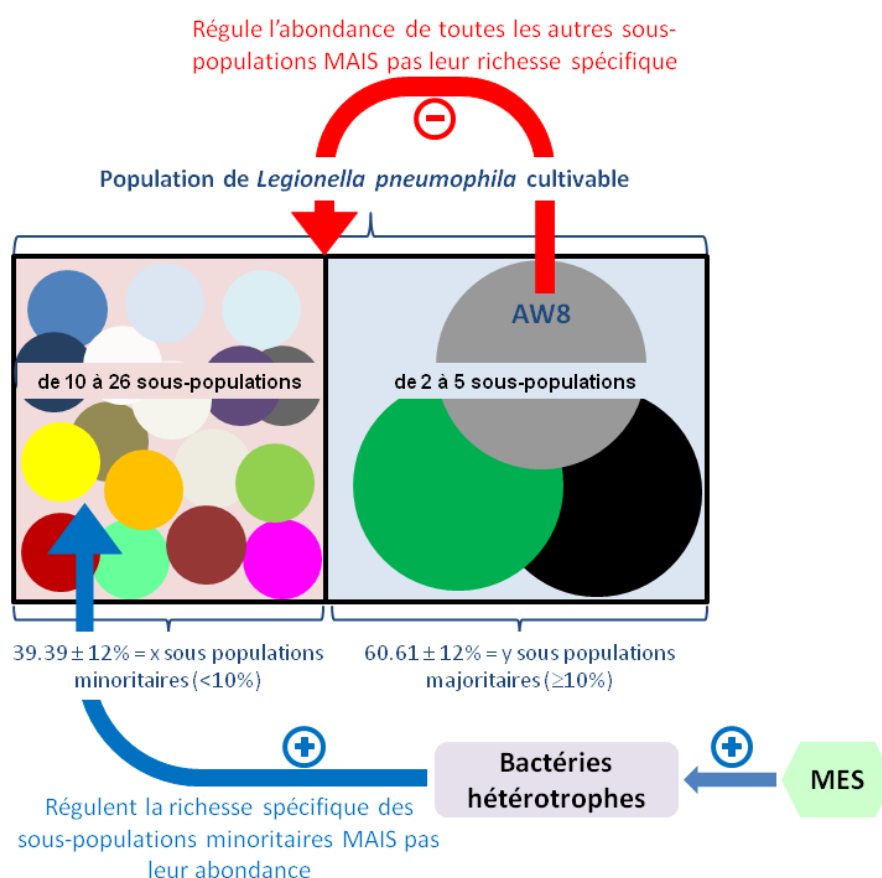


Figure 2-46 : Structure de la communauté de *L. pneumophila* dans le CRF du CNPE de Dampierre et mécanismes hypothétiques de régulation de cette communauté.

L'évolution de la composition en sous-populations de la communauté de *L. pneumophila* dans le CRF de Dampierre a été analysée par nMDS. D'après ces analyses, il semble que la composition en sous-populations de *L. pneumophila* ne suive pas une évolution saisonnière.

Concernant les mécanismes hypothétiques de régulation de la concentration en *L. pneumophila* dans le CNPE de Dampierre (Figure 2-47), il semble que celle-ci soit directement sous l'influence négative du pH et de la flore hétérotrophe, et sous l'influence positive de la teneur en phosphate. Le lien entre la concentration en légionelles et les

facteurs abiotiques de saison est indirect. Les paramètres de saison influenceraient positivement les concentrations en amibes non thermophiles et en *Pseudomonas*, qui elles-mêmes seraient positivement reliées à l'évolution de l'abondance de plusieurs sous-populations, et notamment les sous-populations minoritaires, responsables des variations de concentration en *L. pneumophila* observées. D'après ces résultats, il semble que les paramètres environnementaux influencent de la même manière la concentration en légionelles dans les CNPE de Belleville et Dampierre mais que les voies empruntées pour réguler la concentration en légionelles sont différentes selon le CNPE étudié.

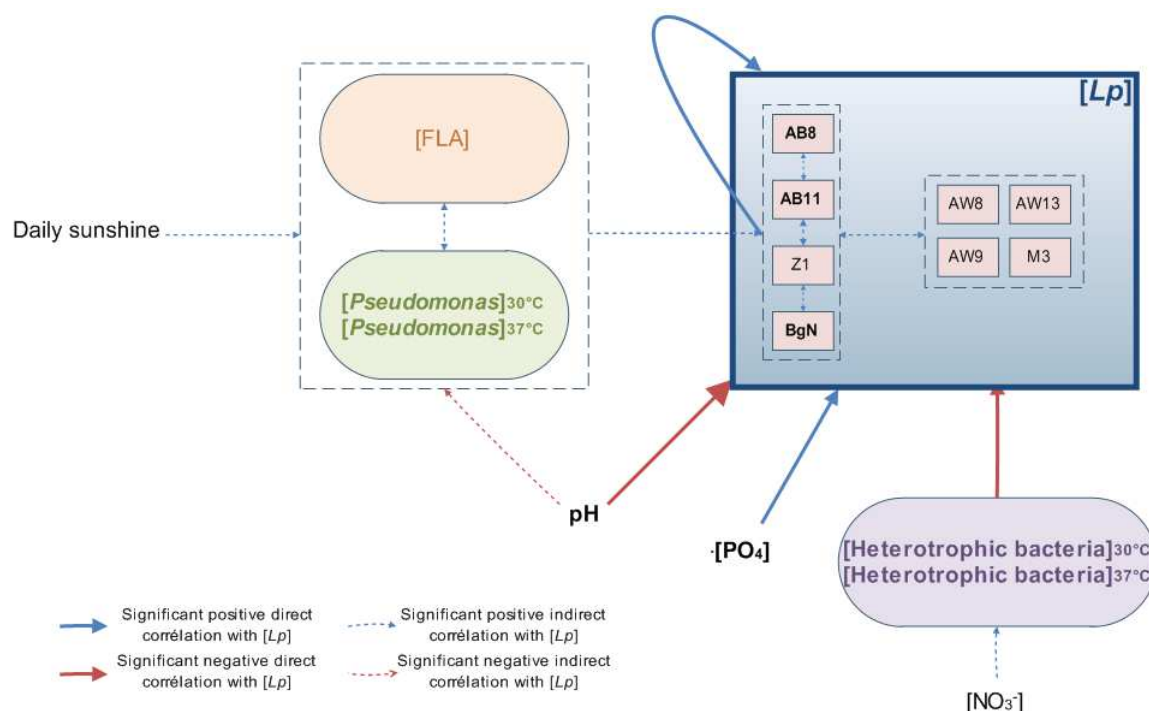


Figure 2-47 : Mécanismes de régulation hypothétiques de la concentration en *L. pneumophila* par les paramètres environnementaux mesurés dans le CNPE de Dampierre.

ARTICLE 3:

***DIFFERENT SPATIO-TEMPORAL DYNAMICS OF *LEGIONELLA*
PNEUMOPHILA SUBPOPULATIONS IN NUCLEAR POWER PLANT
COOLING CIRCUITS***

**Delphine Jakubek, Matthieu Le Brun, Gérard Leblon, Michael
DuBow, Marie Binet**

Soumis pour publication, *Aquatic Microbial Ecology*

PRESENTATION DU TRAVAIL

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de cette étude est de déterminer la distribution des sous-populations de légionelles selon une échelle spatiale, en fonction du CNPE où les sous-populations ont été détectées. L'analyse de la dynamique des communautés de légionelles présentes dans chacun des CNPE permet de mettre en évidence l'influence de paramètres locaux (CRF) et globaux (rivière) sur l'évolution des populations de légionelles.

2. METHODOLOGIE

En plus des prélèvements mensuels réalisés dans les CRF de chacun des CNPE, des prélèvements en rivière ont également été effectués, bien que l'échantillonnage réalisé ne permette pas une bonne représentativité de la diversité des communautés de légionelles en amont et en aval des installations. Les communautés de *L. pneumophila* présentes dans les CRF des CNPE bord de Loire ont été comparées afin de dégager des similitudes ou des différences dans l'écologie des légionelles en fonction des sites et de leurs caractéristiques. La comparaison des communautés de légionelles a été effectuée à partir des prélèvements suffisamment représentatifs, communs aux sites de Belleville, Dampierre et St Laurent ; et en dehors des phases de traitement à la monochloramine dans le CNPE de St Laurent. Pour le CNPE de Chinon, qui est continuellement traité à la monochloramine, l'échantillonnage étant rarement suffisamment représentatif de la diversité réelle, l'analyse a été effectuée en considérant la présence et l'absence de sous-populations au lieu de leur abondance. Les liens entre la concentration en légionelles et les paramètres abiotiques et biotiques ont également été comparés selon les sites dans l'objectif d'identifier, s'ils existent, des paramètres moteurs des variations de concentration en légionelles, ayant le même effet sur les concentrations en légionelles quel que soit le CNPE étudié.

3. RESULTATS

D'après les résultats de cette étude, il apparaît que les communautés de *L. pneumophila* observée dans les CRF des quatre CNPE en bord de rivière présentent des caractéristiques communes dans les CRF de Belleville et Dampierre ainsi que dans ceux de St Laurent et Chinon. Ces deux groupes montrent des différences significatives, à la fois en terme de composition en sous-populations mais aussi en terme de structure de la communauté. La distribution des sous-populations le long du fleuve montre que certaines sont présentes sur une large distance, alors que d'autres semblent spécifiques d'une installation. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les concentrations en *L. pneumophila* sont régulées par des mécanismes différents selon les sites. Dans tous les CNPE étudiés, les mécanismes intra-communautaires, par l'évolution de certaines sous-populations et notamment l'évolution des sous-populations minoritaires, semblent constituer des voies importantes de régulation de la concentration en *L. pneumophila*. Les paramètres microbiologiques et physico-chimiques influencent, de manière générale, les concentrations en *L. pneumophila* par le

biais de leur effet sur les sous-populations de légionelles. Il semble ainsi que les interactions entre compartiments biotiques dépendent de relations souche-spécifiques. De même, il semble que les sensibilités des sous-populations diffèrent en fonction des souches. Les mécanismes de régulation de la concentration en *L. pneumophila* peuvent être groupés en deux classes avec ceux observés à Belleville et Dampierre formant un groupe et ceux observés à St Laurent et Chinon formant le deuxième groupe.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer, à la fois, les différences de mécanisme de régulation de la concentration en *L. pneumophila* et les différences de composition en sous-populations des deux groupes de sites. Une modification majeure de la qualité de l'eau entre les sites de Dampierre et St Laurent pourraient être responsable de ces différences. Les communautés détectées dans les CRF ne seraient donc que le reflet de leurs évolutions en amont des installations. Les CRF peuvent aussi constituer des écosystèmes particuliers qui exercent des pressions de sélection variables (via les caractéristiques physico-chimiques ou microbiologiques des milieux, ou encore via la nature des matériaux des CRF ou la conception des TAR), aboutissant à la sélection de certaines sous-populations.

Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique (présentée ci-dessous) en soumission auprès du journal *Aquatic Microbial Ecology*.

DIFFERENT SPATIO-TEMPORAL DYNAMICS OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* SUBPOPULATIONS IN NUCLEAR POWER PLANT COOLING CIRCUITS

Delphine Jakubek^{a,b*}, Matthieu Le Brun^a, Gérard Leblon^b, Michael DuBow^b and Marie Binet^a

^aEDF R&D, Département LNHE, 6, quai Watier, 78400 Chatou, France

^bUniv Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Bâtiment 409, 91405 Orsay cedex, France

* Corresponding author:

Delphine Jakubek

EDF R&D

Laboratoire National Hydraulique et Environnement

6 quai Watier

78400 Chatou, France

Email: delphine.jakubek@edf.fr;

Tel: + (33)130877519;

Fax: + (33)130877336.

RUNNING TITLE: Different *Legionella* dynamics in cooling circuits

KEYWORDS: *Legionella*, Diversity, Dynamics, IRS-PCR, Cooling circuit

ABSTRACT

Legionella bacteria are ubiquitous in aquatic environments. Among the members of this family, *Legionella pneumophila* is the causative agent of legionellosis disease and is responsible for more than 98% of such cases in France. *L. pneumophila* can be encountered in nuclear power plant cooling circuits. Regulatory monitoring is ongoing but does not permit an improvement of our knowledge of their ecology in cooling circuits. The aim of this study was to compare the dynamics of *L. pneumophila* subpopulations in the cooling circuits of four nuclear power plants located on the same river. *L. pneumophila* subpopulations were measured monthly over one year at the four sites using the molecular typing method, IRS PCR. For each sample, a large set of culturable isolates was subtyped in order to obtain a broad view of these populations. To our knowledge, this is the first time such a study has been performed on this kind of circuit.

This study showed significant differences between the dynamics of the *L. pneumophila* subpopulations at the four sites. A specific distribution of serogroups was observed across the four sites and a similar separation appeared with regard to the composition of the *L. pneumophila* IRS PCR subtypes between sites. Moreover, correlation tests have shown that the culturable *L. pneumophila* concentrations determined for each sample were linked to environmental factors in different or even opposite ways, depending on the sites. These results suggest that the dynamics of *L. pneumophila* bacteria are influenced by cooling circuit structure-specific factors.

INTRODUCTION

Legionella pneumophila, the causative agent of legionellosis, responsible for more than 98% of cases in France (Campese et al. 2010), can be encountered in nuclear power plant cooling circuits under suitable conditions for its survival and development. Indeed, the presence of nutrients (suspended solids, organic matter, etc.), favourable growth temperatures (30 to 50°C for hot parts and 18 to 38°C for cold parts), the presence of oxygen and the presence of biofilms constitute a favourable environment for the development of many microorganisms. Bacteria of the genus *Legionella* are hydrotelluric and can be found in natural as well as in artificial aquatic environments (Che et al. 2009). The sources most often involved in legionellosis cases are hot water system networks, air conditioning systems and cooling towers (Fernandez et al. 2002, Jansa et al. 2002, Campese et al. 2011). The nuclear power plant cooling towers in France have never been implicated in legionellosis cases. However, since 2004, regulatory monitoring of *Legionella* concentrations in nuclear power plant cooling circuits has been enforced. This regulatory control involves counting culturable *Legionella* spp. and *L. pneumophila* according to the French Standard methodology (Association française de Normalisation 2006). If the concentration levels are above the regulatory thresholds, corrective actions are taken. Thus, in some cooling circuits, a chemical treatment is used to limit the proliferation of *Legionella* (or other pathogens such as *Naegleria fowleri*) and to ensure that the thresholds are not exceeded. In these cases, the treatment used is the continuous or sequential injection of the chlorinated biocide, monochloramine. However, to anticipate and better understand the proliferation of *Legionella* in nuclear power plant cooling circuits, it is necessary to improve our knowledge of their diversity and dynamics in this kind of system.

Few previous studies have focused on the presence of this bacteria genus in nuclear power plants (Bonnell & Rippon 1985, Deubner et al. 1986, Morton et al. 1986, Werner 1987), and they have not investigated the ecological aspects of *Legionella* bacteria in such systems. In other artificial water systems, such as drinking water networks, sanitary hot water networks or cooling towers, parameters such as temperature (Borella et al. 2004, Mathys et al. 2008, Carducci et al. 2010, Wullings et al. 2011), the presence of metals such as iron and copper (Stout et al. 1992, Borella et al. 2004, Allard et al. 2009, Bargellini et al. 2011), or the presence of biofilms (Stout et al. 1985, Cooper & Hanlon 2010) or protozoa such as amoebae (Yamamoto et al. 1992, Berk et al. 2006, Moore et al. 2006) have been linked to the development of *Legionella*. In natural aquatic environments, *Legionella* proliferation mechanisms are poorly understood. *Legionella* bacteria use different strategies to survive, including intracellular replication in free-living amoebae (Harf & Monteil 1988, Molmeret et al. 2005), persistence in biofilms (Declerck et al. 2007, Declerck 2009) and entry into a viable but non-culturable state (Yamamoto et al. 1996, Dusserre et al. 2008).

The aim of this study was to compare the dynamics of culturable *L. pneumophila* in different nuclear power plant cooling circuits and to determine whether they respond to general phenomena or to specific parameters in the cooling circuits studied. To our knowledge, this is the first time that a study has aimed to characterise *L. pneumophila* subpopulations in such artificial conditions. To achieve these objectives, culturable *L. pneumophila* subpopulations were regularly monitored over the course of one year in the cooling circuits at four nuclear power plants, all of which are located on the River Loire (France). Culturable *L. pneumophila* subpopulations were identified, at the subspecies level, using a molecular typing method known as Infrequent Restriction Site PCR (IRS PCR). This method has been validated in a previous study for the ecological monitoring of *L. pneumophila* on a large scale (Jakubek et al. in press). Simultaneously, physicochemical and microbiological water characteristics were determined with the aim of identifying abiotic and biotic links between *L. pneumophila* dynamics and the environment.

MATERIALS AND METHODS

STUDY SITES AND SAMPLE COLLECTION

The four nuclear power plants studied are located on the River Loire (Figure 1). The most upstream plant, site A, is located 385 km away from the river source. It is composed of two 1300 MW power plant units. The next site, site B, is located 37 km away from the first and comprises four 900 MW power plant units. Sites C and D are 98 and 227 km further downstream, respectively. These two sites are equipped with 900 MW power plant units (two at site C and four at site D). The power plant units at site D are continuously treated with monochloramine at a concentration of 0.25 mg.l⁻¹. Production unit 1 at site C was treated with monochloramine at 0.2 mg.l⁻¹ for two months from 30 July to 25 September, 2010. All of the other units at sites A and B are untreated.

Samples were collected monthly, between March 2010 and March 2011, from the cold basin waters at units 1 and 2 at site A, unit 4 at site B, units 1 and 2 at site C, and unit 3 at site D. The use of the production units for sampling was dependent on their availability. They were named A1- or A2-MAR10 to A1- or A2-MAR11, B4-MAR10 to B4-MAR11, C1- or C2-MAR10 to C1- or C2-MAR11 and D3-MAR10 to D3-MAR11 for those at sites A, B, C and D respectively.

In August 2010, samples were also collected from the River Loire, upstream or downstream from the sites.

Samples were collected on the same day for sites A and B, and one and two days later for sites D and C respectively; they were treated in a mobile laboratory on the same day on which the samples were taken, or stored at 4°C for analysis 24 hours later. Samples collected from disinfected circuits were treated with sodium thiosulfate (20 mg.l⁻¹) to quench the monochloramine residual.

PARAMETERS MEASURED

A set of physicochemical and microbiological parameters was measured for this study. Among these, water and air temperatures, pH, conductivity, oxygen saturation and dissolved oxygen concentration were measured immediately during the sampling time. An external laboratory (Laboratoire Ianesco, Poitiers) performed different chemical analyses according to French Standard methodologies: concentration of total and dissolved organic carbon (TOC, DOC), calcium and magnesium, biological and chemical demand for oxygen, suspended solids (SS), nitrate, nitrite, ammonium, Kjeldahl nitrogen, phosphate and chlorophyll a.

The microbiological analyses involved determining, by culture, the concentrations of different microorganisms: *L. pneumophila*, *Pseudomonas* sp., heterotrophic bacteria and thermophilic or non-thermophilic free-living amoebae (Jakubek et al. submitted for publication AME-2876).

IDENTIFICATION OF CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* SUBPOPULATIONS

For each sample, a set of 100 culturable isolates, where possible, was identified to ensure a correct representativeness of *L. pneumophila* diversity. The number of strains to be identified was chosen according to previous results (Jakubek et al. submitted for publication).

Culturable *L. pneumophila* subpopulations were identified using the Infrequent Restriction Site PCR (IRS PCR) technique, a molecular typing method developed for the *Legionella* genome by (Riffard et al. 1998) and validated for an ecological study of *Legionella* strains on a large scale (Jakubek et al. in press). After characterising their genus, species and serogroups, *L. pneumophila* strains were cultured on BCYE medium for 72 hours at 37 ± 2°C. Extracted and purified DNA was then digested by two restriction enzymes, namely XbaI, which frequently cleaves DNA, and PstI, which infrequently cleaves DNA. Following digestion, adaptors were ligated to the cohesive ends of the cleaved fragments. These adaptors were constructed as previously described (Riffard et al. 1998). A second digestion step was then performed, followed by PCR amplification and vertical gel electrophoresis. All experiments included negative (without DNA) and positive (DNA of strains with known IRS PCR patterns) controls, which were processed with the samples.

IRS PCR patterns were used to define the *L. pneumophila* subspecies. Patterns were analysed by the GelCompar® II version 6.0 software (Applied Maths, Belgium). IRS PCR fingerprints from the different gels were interpreted via differences between banding patterns according to published guidelines (Struelens 1996). Where no differences were found between banding patterns, strains were considered identical. Where differences were found in four or more fragments, strains were considered to be separate types. Strains differing in up to

three fragments only were considered to be subtypes. A capital letter was used to define a distinct type, and a numerical suffix was used to indicate the subtype profile.

STATISTICAL ANALYSIS

For each sample, the representativeness of the sampling of the culturable *L. pneumophila* strains was validated by rarefaction curves and by calculating the sample coverage rate for 100 strains as previously described (Jakubek et al. submitted for publication AME-2876).

The diversity indices used for this study were the Chao1 species richness estimator (Chao 1984), the Shannon diversity index (Shannon 1948, Shannon & Weaver 1949) and the Pielou equitability index (Pielou 1975).

An index called D_S , allowing quick access to the degree of dominance of serogroup 1 or serogroups 2 to 14, was specifically designed for this study:

$$D_S = \frac{n_{sg1} - n_{sg2.14}}{N}$$

where D_S is the serogroup dominance index, ranging from -1 (all strains belong to serogroups 2 to 14) to +1 (all strains belong to serogroup 1) through 0 (equivalent distribution between the two groups of serogroups); n_{sg1} is the number of strains belonging to serogroup 1, $n_{sg2.14}$ is the number of strains belonging to serogroups 2 to 14, and N is the total number of strains tested.

Statistical analyses were performed using a non-parametric Multi-Dimensional Scaling (nMDS) test associated with the Bray Curtis index, Principal Component Analysis (PCA) with the Pearson correlation coefficient, and Cluster Analysis using the Euclidean similarity measure with Ward's algorithm method.

ANOVA and ANOSIM tests (analysis of similarities) were also used to determine whether or not the *L. pneumophila* community composition was statistically different between sites (see Parthuisot et al., 2010, for explanations).

All statistical tests were performed using Past software, version 2.01 (Hammer et al. 2001).

RESULTS

DESCRIPTION OF SAMPLES

nMDS analyses based on Pearson coefficients showed that the water samples had similar physicochemical qualities (based on measured parameters) except for some parameters where changes were linked to the use of monochloramine treatment at site D (data not shown). These parameters, $[\text{NO}_2^-]$ and $[\text{NH}_4^+]$ showed a slight significant Pearson correlation with the distance from the river source ($r_p > 0.55$ and $p\text{-value} < 0.05$). Other parameters showed seasonal changes: sunshine duration, water and air temperatures, $[\text{Chla}]$, $[\text{NO}_3^-]$ and the amounts of total nitrogen. For all sites, the samples collected in April and May were characterised by a high content of chlorophyll a and an elevated biological oxygen demand. Samples collected in January had high amounts of organic matter (TOC, DOC, SS), whereas parameters linked to water mineralisation characteristics (pH, conductivity, Ca^{2+} , Mg^{2+}) were low. Conversely, low amounts of organic matter and high water mineralisation were observed for samples collected in February and March.

Regarding *L. pneumophila* concentrations in the cooling circuits (Figure 2), site B presented the highest levels, followed by site A, then C and D.

The colonisation rates observed at site C changed considerably during the year, with a variation of 2.46 log units of concentration. This change was probably due to the use of treatment. The cooling circuits at sites B and D showed a change of 1.81 and 1.86 log units respectively, whereas at site A, the *L. pneumophila* concentration changed by only 1.03 log units.

SPATIAL DYNAMICS OF CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* SUBPOPULATIONS

At the four studied sites, a total of 114 subpopulations were detected using the IRS PCR typing method. Just below 50% of these were detected at more than one site. Others were present at only one site. Figure 3 represents, in the form of a Venn diagram, the distribution of subpopulations isolated at the different sites on the River Loire. During this study, samples were also collected from the river, upstream or downstream from the sites. Despite the insufficient representativeness of *L. pneumophila* diversity (based on rarefaction curves and coverage sample rates, not shown), these samples nonetheless provide useful information. At site A, 61 subpopulations were present, 74% of these were shared with other sites and at least 10% were also detected in the river. Among the 57 subpopulations present at site B, 77% were shared and a minimum of 7% were also present in the river. Water collected at site C was composed of 60 subpopulations, of which 52% were present at other sites and at least 13% were detected in the river. Site D contained only eight subpopulations, of which five were shared with other sites and at least two were detected in the river. Thus, among the 114 subpopulations detected during the period, 53 were shared among different sites and at least 13 were also detected in the river. These subpopulations seemed to be present over a large distance, from 37 km (the shortest distance between two sites, A and B) to at least 265 km (the greatest distance, between sites A and D). Moreover, different subpopulations were present at more than one site but were absent at the upstream sites. Indeed, at site B, 21 subpopulations were present but were undetected at site A. At sites C and D, 29 and three subpopulations, respectively, were not detected upstream from the sites.

COMPARISON OF THE CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* COMPOSITION IN THE COOLING WATERS AT THE FOUR SITES

Depending on the culturable *L. pneumophila* concentrations, it was often a challenge to isolate 100 strains per sample and to ensure correct representativeness. Samples with a sample coverage rate to 0.750 were considered to be usable in terms of diversity, and the subpopulations detected were representative of the true richness of the sample. The comparison analysis of the *Legionella* composition and of the diversity of the water from the four sites was performed only on samples showing good representativeness ($\hat{C} > 0.750$), *i.e.* on all samples collected from site A, nine from site B, eight from site C and only two from site D (data not shown). For this analysis, we assumed that the *L. pneumophila* composition across the nuclear units at the same site was similar, despite a difference in concentration levels, as a previous study supports this idea (Jakubek et al. submitted for publication). Thus, *Legionella* compositions from the nuclear unit water at the same site are merged.

Serogroups of all strains isolated from the water in the cooling circuits were identified by latex agglutination. A one-way ANOVA test showed that the serogroup distribution at sites A and B was significantly different from that at sites C and D ($p\text{-value} < 0.0005$ for all). Sites A and B were characterised by a dominance of serogroup 1 (annual average of $D_5 > 0.5$) whereas sites C and D presented a dominance of serogroups 2 to 14 (annual average of $D_5 < -0.35$) (Figure 4).

This separation was also found in the composition of culturable *L. pneumophila* subpopulations. An nMDS analysis based on the Bray Curtis index (Kruskal Stress = 0.1974) showed a clear separation between sites A and B, versus sites C and D (Figure 5). An ANOSIM test (10,000 permutations, based on two groups formed by the relative abundance of subpopulations detected at sites A and B for group one, and sites C and D for group two) was performed to confirm this result. With an R value close to one ($R = 0.8586$, $p\text{-value} < 0.0001$), the test indicated that the composition of the *L. pneumophila* subpopulations at sites A and B was statistically different from that at sites C and D.

COMPARISON OF BIOTIC AND ABIOTIC LINKS RELATED TO CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* CONCENTRATIONS AT THE FOUR SITES

From the parameters measured, it is possible to determine possible links between culturable *L. pneumophila* concentrations and environmental factors. Correlation tests based on Pearson coefficients and PCA were performed to achieve this goal. This study was conducted over common periods between samples, and the representativeness of the sampling was sufficient. The samples chosen for this study were those collected in April and May 2010 and from January to March 2011. For site D, where continuous monochloramine treatment was used, the representativeness of the sampling was not guaranteed. Thus, during the analysis, only the presence / absence of subpopulations was considered and not the absolute abundance (corresponding to the product of relative abundance with the *L. pneumophila* concentration) of subpopulations, as was the case for the other sites.

Figure 6 shows the Pearson coefficient values between the *L. pneumophila* concentrations and the different environmental factors for each site. It shows firstly that the links between the physicochemical parameters and the *L. pneumophila* concentrations at sites A and B were contrary to those at sites C and D. Indeed, seasonal parameters had strong positive links (and, conversely, strong negative links for nitrate and nitrogen amounts) with the *Legionella* concentrations observed at sites A and B, whereas they were negatively linked with the concentrations at sites C and D. The same observation was made regarding the links between the *L. pneumophila* concentrations and the mineralisation parameters, which showed negative trends at sites A and B and strong ($r_p > 0.7$) or slight positive links at sites C and D respectively. The characteristic parameters of the amounts of organic matter were positively related to the *Legionella* concentrations at sites A, B and D whereas they were negatively linked at site C.

Regarding the microbiological parameters, the *L. pneumophila* concentration showed a negative link with the heterotrophic plate counts and strong positive links with the quantities of amoebae and *Pseudomonas* at sites A and B. Conversely, the *L. pneumophila* concentration at site C showed a strong positive link with the heterotrophic plate counts, whereas other microbiological parameters had negative links with the concentration. Site D was characterised by negative trends for all microbiological parameters except for the

quantities of amoebae, which did not seem to be linked to the *L. pneumophila* concentrations in the cooling circuits.

Among the *L. pneumophila* subpopulations detected during this study, some of them seemed to be related to the *L. pneumophila* concentration observed at one or more sites and showed a significant Pearson correlation coefficient ($p\text{-value} < 0.05$). Among them, only six were shared by two or more sites, including the AK3, G7, M3, Q3 and U3 subpopulations, and the set of minority subpopulations forming the group known as BgN. These subpopulations showed the same trends at the shared sites. This was the case for the BgN, Q3 and U3 subpopulations, which were positively or negatively linked to the *L. pneumophila* concentration.

A converse trend could also be observed for some subpopulations shared among sites. As an example, the G7 subpopulation was related to the *L. pneumophila* concentration at sites A, B and C in either a positive (sites B and C) or a negative (site A) way. Similarly, the M3 subpopulation was positively correlated with the *L. pneumophila* concentration at sites A and B, whereas it was negatively related at site C.

These results suggest that the *L. pneumophila* concentrations were not influenced by the same parameters depending on the site. The nuclear power plant cooling circuits at sites A and B seemed to have similar regulatory mechanisms for *L. pneumophila* concentrations but these mechanisms seemed to be contrary to those encountered at sites C and D (Figure 7). The Pearson coefficient values between the *L. pneumophila* concentrations and the environmental parameters measured show a clear separation between sites A and B versus sites C and D. This hierarchical clustering diagram was constructed based on Euclidean distance measures and Ward's algorithm.

DISCUSSION

Few studies have reported on the diversity and dynamics of *Legionella* subpopulations in nuclear power plant cooling circuits. Variable *L. pneumophila* concentrations were simultaneously observed at different power plants located on the same river. To our knowledge, this is the first time that such a study has been performed. Currently, predictive factors for *Legionella* proliferation are still unknown and differences observed between *L. pneumophila* concentrations in cooling circuits at different power plants are unexplained. This study is, therefore, part of an overall goal to increase our knowledge of the ecology of *Legionella* bacteria in cooling circuits.

The results from this study were analysed in two phases. First, the spatial dynamics of *L. pneumophila* subpopulations across the four power plants was studied. Among the subpopulations detected, about 50% seemed to be present at only one site, whereas others were shared across more than one cooling circuit. Although under-representative, river samples were composed of the same subpopulations as those present in the cooling circuits. Moreover, the cooling circuits at the nuclear power plants, located at a distance of between 40 and 130 km apart, seemed to be poorer in certain subpopulations but enriched in others.

This study also demonstrated significant differences between the composition of *L. pneumophila* communities at sites A and B compared with sites C and D. Firstly, the serogroup distribution was not similar at the four sites. Indeed, sites A and B were composed of a majority of serogroup 1, whereas sites C and D presented a dominance of serogroups 2

to 14. As suggested by Verissimo et al. (1991) in a study conducted in hydrothermal areas, this spatial distribution of serogroups is probably due to site-specific factors, which have not been identified either by their study or ours. Secondly, this separation between the two groups of sites was also found in *L. pneumophila* subpopulations. The composition of subpopulations identified using the IRS PCR typing method, at site A was close to that at site B but clearly different from that observed at sites C and D. This split between the two groups of sites was highlighted by a study conducted over one year and should be confirmed based on a longer period to determine the inter-annual evolution of the *Legionella* community. However, this split was also found in relationships between the *L. pneumophila* concentrations and the environmental conditions. Abiotic factors, such as parameters relating to the season (water and air temperature, nitrate amounts) or to mineralisation (pH, conductivity, oxygen, etc.), and biotic factors (quantities of heterotrophic bacteria, amoebae or *Pseudomonas*) seemed to have different or even converse effects on the *L. pneumophila* concentrations.

All these results show that different selection pressures occur in the two groups of sites, which appear to lead to dissimilar distributions in the *L. pneumophila* serogroups and subpopulations and different regulatory mechanisms for the *L. pneumophila* concentrations.

On the basis of these results, different hypotheses may be considered. The first one is that the monochloramine disinfection treatment selects different subpopulations, leading to specific *Legionella* community compositions, which are statistically different from those observed in untreated cooling circuits. However, water collected at site C before the implementation of monochloramine treatment (the cooling circuits at site C were never treated before this date) presented a different *Legionella* community composition from that observed at sites A and B, but close to that observed at site C during treatment and at site D (continuously treated). Thus, differences observed between the *Legionella* community compositions at sites A and B, compared with sites C and D, cannot be solely attributed to the presence of biocide in the latter two nuclear power plant cooling circuits. To explain these results, other hypotheses must be advanced. Firstly, we can assume that all subpopulations are naturally present in the river and cooling circuits, due to selection pressures that depend on different parameters, which have still not been identified, allowing the development or survival of only certain subpopulations. Selection pressures can also be involved in the subpopulation dynamics of *L. pneumophila* along the river, *i.e.* the evolving environmental conditions along the river could modify the spatial distribution of subpopulations in the river itself and in the different cooling circuits encountered along the river. Different studies have identified some of these factors, including pH or biofilm and amoeba presence, which enhance the survival of *Legionella* in rivers (Declerck et al. 2007, Lau & Ashbolt 2009, Parthuisot et al. 2010). These parameters are subjected to changes in the water discharged from different man-made systems along the river, inducing changes in the *Legionella* population structure. A recent study conducted by Parthuisot et al. (2010) demonstrated that *Legionella* species are present from the source of the river and could originate from groundwater or atmospheric inputs (Costa et al. 2005, Sakamoto et al. 2009). During this study, Parthuisot et al. (2010) showed that no changes in *Legionella* populations occur along the river, between the upstream and downstream sampling sites. This work concluded that *Legionella* species are able to survive along the river over a large distance despite environmental pressure. Although this study was performed on *Legionella* species, this research leads to the idea that the *L. pneumophila* subpopulation variations observed at

the four sites studied along the River Loire are due to different selection pressures from the cooling circuits. However, the study performed by Parthuisot et al. (2010) was conducted on a pristine river, the Tech, which is 84 km long with a mean flow of $9.6 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, whereas the Loire is 1,013 km long and has an average flow of $931 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Moreover, the River Loire passes through large cities, and the discharge water sources from man-made systems are numerous, which is not the case for the River Tech.

The dichotomy, based on the *L. pneumophila* subpopulations and the serogroup distributions between the two groups of sites, could also be due to the difference in the structure of the cooling circuits and towers. Indeed, at sites A and B the cooling circuits have cooling exchangers made of brass, whereas sites C and D have cooling exchangers made of stainless steel (site D), plus brass or titanium (site C). Copper is known to have a significant effect on *Legionella* bacteria. Within a certain range of copper concentrations, copper plumbing systems may be protective against *Legionella* colonisation (Stout et al. 1992, Borella et al. 2004, Bargellini et al. 2011). However, other studies have shown that copper ions may stimulate *Legionella* growth (Mathys et al. 2008). Iron is an essential element for *Legionella* growth. Water networks in which plumbing systems are subject to corrosion release an amount of iron which is known to enhance *Legionella* development (States et al. 1985).

Moreover, the cooling tower structures are not identical between sites (Figure 8). The power plant units at sites A and B are composed of natural counterflow cooling towers, whereas at sites C and D, the cooling towers operate by natural or mechanical crossflow. Differences between the cooling towers' structures lead to variability in the air / water exchange dynamics, sensitivity to scaling, sediment and biofilm formation (unpublished results).

All these elements could explain differences in the *L. pneumophila* dynamics observed at the four sites and lead us to believe that these dynamics originate from cooling circuit structure-specific factors. Laboratory or pilot scale studies should be conducted to verify these assumptions and to identify factors associated with *L. pneumophila* dynamics in cooling systems. This study also shows that increased knowledge of the ecology of *Legionella* in natural aquatic environments, such as along a river, is necessary to better understand phenomena observed in artificial environments. A study of the river water, performed in the same way as this one, could allow us to determine whether the spatial distribution of *L. pneumophila* subpopulations is influenced by the river quality or by the characteristics of the nuclear power plant cooling circuit. This kind of study would necessitate a greater sampling effort due to the low *Legionella* concentrations observed in the river. A metagenomic approach or a method that does not necessitate culturing procedures could be more appropriate, but obtaining representative diversity may be difficult due to the biases and the determination of subspecies associated with such a technique.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Electricité De France (EDF) and from the National Association for Research and Technology (ANRT) which are linked together by an industrial research training contract (CIFRE).

Emilie Lehericey (EDF R&D) and Gaelle Le-Meur (Ajilon Engineering) are particularly acknowledged for their contribution to the sampling campaigns and to the performance of

laboratory tests. We also thank our nuclear power plant partners, Guy Perrichon (EDF DPN), Corinne Mounier (EDF DPN), Jean Brunet (EDF DPN) and Corinne Gitton (EDF DPN) who provided access to the plant and allowed us to conduct this study.

LITERATURE CITED

- Allard KA, Dao J, Sanjeevaiah P, McCoy-Simandle K, Chatfield CH, Crumrine DS, Castignetti D, Cianciotto NP (2009) Purification of legiobactin and importance of this siderophore in lung infection by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 77:2887-2895
- Association française de Normalisation (2006) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila*: Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. NF T90-431. In:
- Bargellini A, Marchesi I, Righi E, Ferrari A, Cencetti S, Borella P, Rovesti S (2011) Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Res* 45:2315-2321
- Berk SG, Gunderson JH, Newsome AL, Farone AL, Hayes BJ, Redding KS, Uddin N, Williams EL, Johnson RA, Farsian M, Reid A, Skimmyhorn J, Farone MB (2006) Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ Sci Technol* 40:7440-7444
- Bonnell JA, Rippon JE (1985) *Legionella* in power station cooling waters. *The Lancet* 2:327-328
- Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, Neglia R, Marchesi I, Fantuzzi G, Tatò D, Napoli C, Quaranta G, Laurenti P, Leoni E, De Luca G, Ossi C, Moro M, Ribera D'Alcalà G (2004) *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis* 10:457-464
- Campese C, Jarraud S, Maine C, Che D (2011) Legionnaires' disease in France: increase of the number of cases in 2010. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire : BEH* 29-30:325-327
- Campese C, Maine C, Che D (2010) Les cas de légionellose déclarés en France en 2009. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire : BEH* 31-32:334-335
- Carducci A, Verani M, Battistini R (2010) *Legionella* in industrial cooling towers: monitoring and control strategies. *Lett Appl Microbiol* 50:24-29
- Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand Stat Theory Appl* 11:265-270
- Che D, Campese C, Jarraud S (2009) Légionelles et légionellose : qu'a-t-on découvert depuis 30 ans ? *Pathologie Biologie* 59:134-136
- Cooper IR, Hanlon GW (2010) Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *Journal of Hospital Infection* 74:152-159
- Costa J, Tiago I, Da Costa MS, Verissimo A (2005) Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 71:663-671

- Declerck P (2009) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. Environ Microbiol 9999
- Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F (2007) Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. Water Res 41:3159-3167
- Deubner DC, MacCormack JN, Kleeman K, Muhlbaier LH (1986) One-time screening to define the problem: *Legionella* exposure in an electric power company. J Occup Med 28:670-673
- Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M (2008) A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *legionellae* that can recover their cultivability. Appl Environ Microbiol 74:4817-4824
- Fernandez J, Lopez P, Orozco D, Merino J (2002) Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21:729-735
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis . Palaeontologia Electronica 4:4-9
- Harf C, Monteil H (1988) Interactions between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. Water Sci Technol 20:235
- Jakubek D, Le Brun M, Leblon G, DuBow M, Binet M (in press) Validation of IRS PCR, a molecular typing method, for the study of the diversity and population dynamics of *Legionella* in industrial cooling circuits. Lett Appl Microbiol
- Jansa J, Caylà J, Ferrer D, Gracia J, Pelaz C, Salvador M, Benavides A, Pellicer T, Rodriguez P, Garcés J, Segura A, Guix J, Plasencia A (2002) An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: importance of the first 24 hours in the investigation. Int J Tuberc Lung Dis 6:831-838
- Lau HY, Ashbolt NJ (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. J Appl Microbiol 107:368-378
- Mathys W, Stanke J, Harmuth M, Junge-Mathys E (2008) Occurrence of *Legionella* in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating. Int J Hyg Environ Health 211:179-185
- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Appl Environ Microbiol 71:20-28
- Moore MR, Pryor M, Fields B, Lucas C, Phelan M, Besser RE (2006) Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp. Appl Environ Microbiol 72:378-383
- Morton S, Bartlett CL, Bibby LF, Hutchinson DN, Dyer JV, Dennis PJ (1986) Outbreak of Legionnaires' disease from a cooling water system in a power station. Br J Ind Med 43:630-635
- Parthuisot N, West NJ, Lebaron P, Baudart J (2010) High diversity and abundance of *Legionella* spp. in a pristine river and impact of seasonal and anthropogenic effects. Appl Environ Microbiol 76:8201-8210

- Pielou EC (1975) Ecological diversity., Vol. Wiley
- Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J (1998) Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol 36:161-167
- Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Kato N, Matsubayashi K, Okumiya K, Yamaguchi K (2009) *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. Emerg Infect Dis 15:1295-1297
- Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. The bell system technical journal 27:379-423, 623-656
- Shannon CE, Weaver W (1949) The Mathematical Theory of Communication, Vol. University of Illinois Press
- States SJ, Conley LF, Ceraso M, Stephenson TE, Wolford RS, Wadowsky RM, McNamara AM, Yee RB (1985) Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. Appl Environ Microbiol 50:1149-1154
- Stout JE, Yu VL, Best MG (1985) Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. Appl Environ Microbiol 49:221-228
- Stout JE, Yu VL, Yee YC, Vaccarello S, Diven W, Lee TC (1992) *Legionella pneumophila* in residential water supplies: environmental surveillance with clinical assessment for Legionnaires' disease. Epidemiol Infect 109:49-57
- Struelens MJ (1996) Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect 2:2-11
- Verissimo A, Marrao G, da Silva FG, da Costa MS (1991) Distribution of *Legionella spp.* in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of Sao Miguel, Azores. Appl Environ Microbiol 57:2921-2927
- Werner HP (1987) Presence and significance of *Legionella* in power station cooling systems. Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg 72:147-153
- Wullings BA, Bakker G, van der Kooij D (2011) Concentration and diversity of uncultured *Legionella spp.* in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. Appl Environ Microbiol 77:634-641
- Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T (1996) Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. FEMS Microbiol Ecol 20:149-154
- Yamamoto H, Sugiura M, Kusunoki S, Ezaki T, Ikeda M, Yabuuchi E (1992) Factors stimulating propagation of *Legionellae* in cooling tower water. Appl Environ Microbiol 58:1394-1397

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Study sites located on the River Loire (France).

FIGURE 2: *L. pneumophila* concentrations determined using the culture method at the different units at the four studied sites.

FIGURE 3: Venn diagram representing the spatial distribution of the *L. pneumophila* subpopulations detected in cooling circuits at the four studied sites and along the River Loire.

FIGURE 4: Serogroup distribution of *L. pneumophila* isolates at the four studied sites depending on the distance from the source of the River Loire.

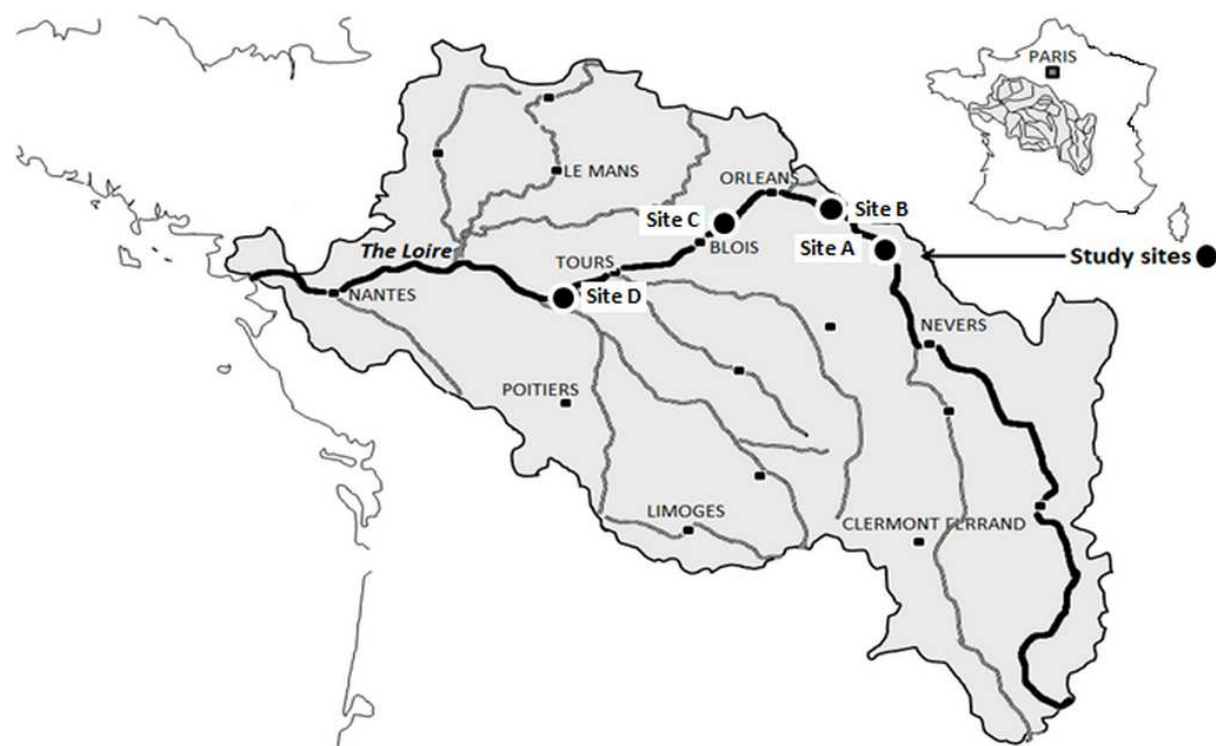
FIGURE 5: nMDS analysis, based on the Bray Curtis index (Kruskal stress = 0.1974), of the *L. pneumophila* community composition between sites and sampling dates.

FIGURE 6: Pearson coefficient values between *L. pneumophila* concentrations, determined for each sample using the culture method, and various environmental factors.

FIGURE 7: Hierarchical clustering diagram constructed using the Euclidean distance and Ward's algorithm, based on Pearson values between *L. pneumophila* concentrations and various environmental factors.

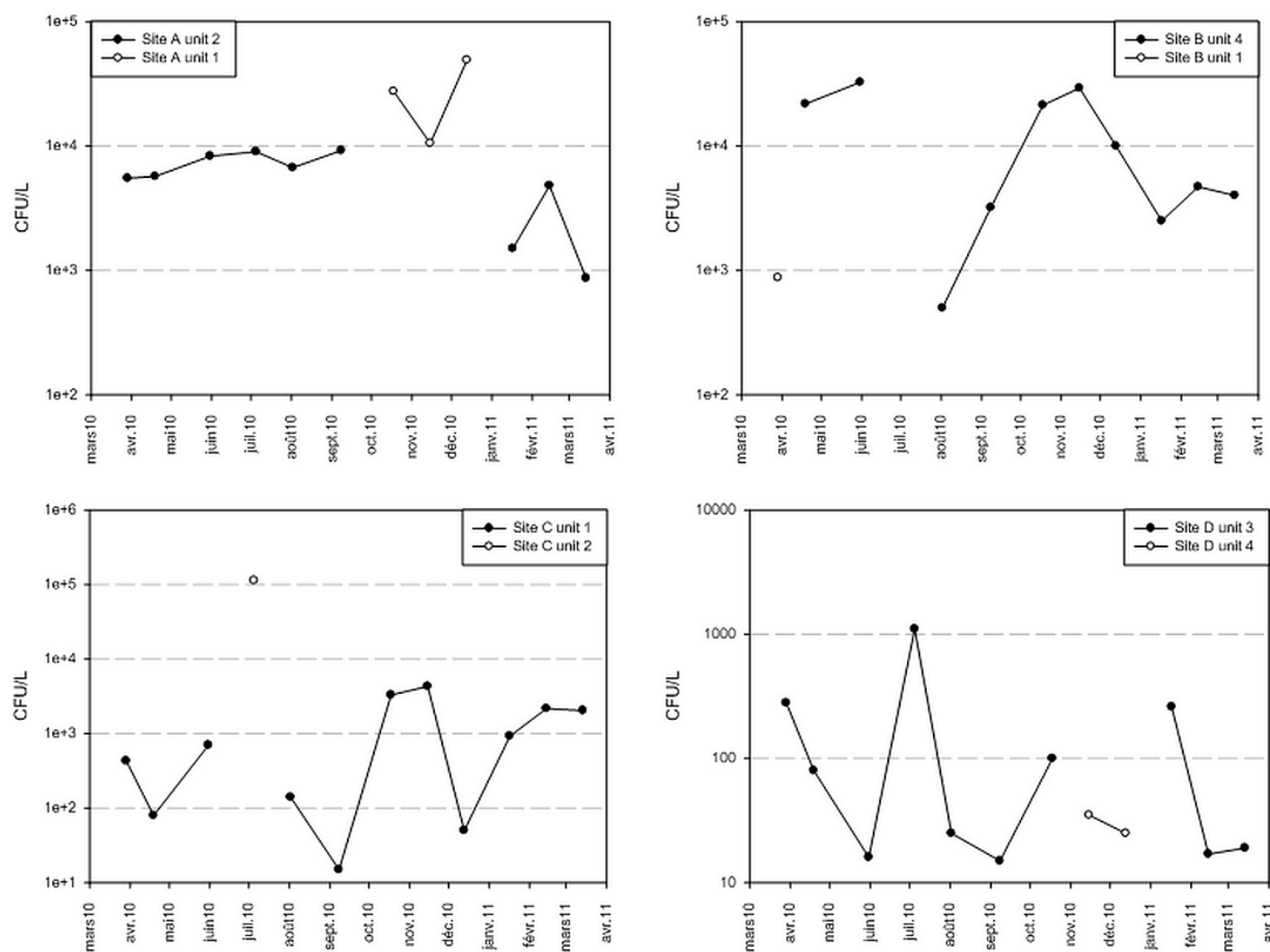
FIGURE 8: Cooling tower structures encountered at the four studied sites.

FIGURE 1



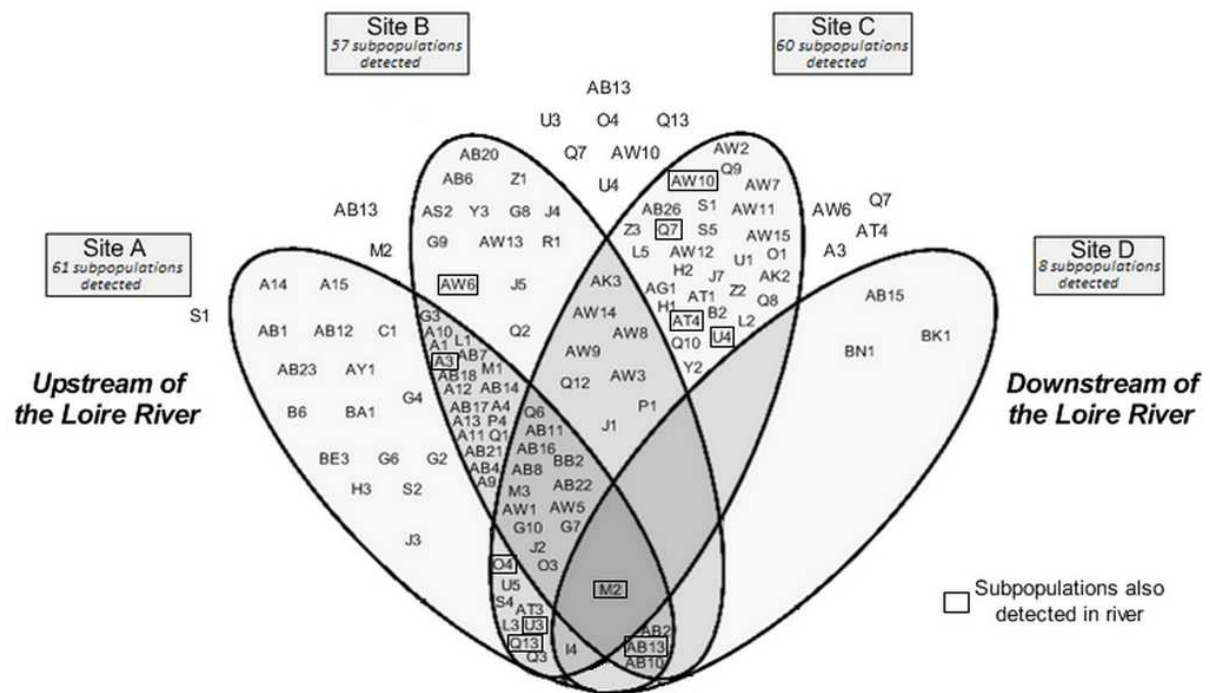
Study sites located on the River Loire (France).

FIGURE 2



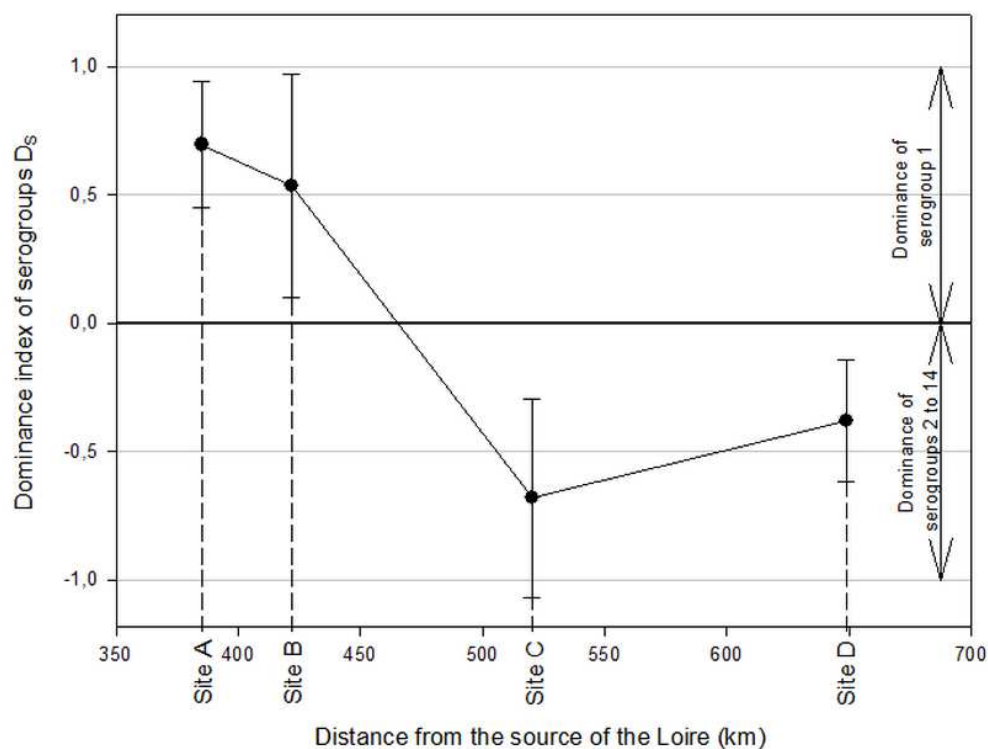
L. pneumophila concentrations determined using the culture method at the different units at the four studied sites.

FIGURE 3



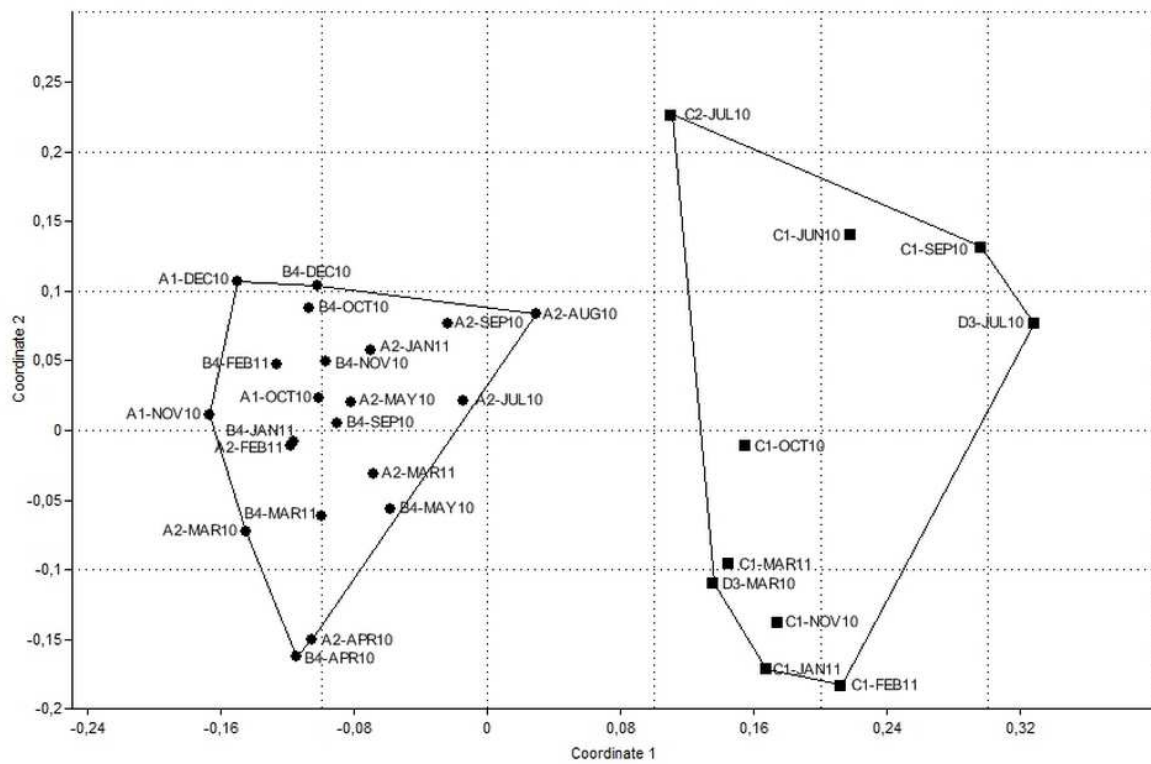
Venn diagram representing the spatial distribution of the *L. pneumophila* subpopulations detected in cooling circuits at the four studied sites and along the River Loire.

FIGURE 4



Serogroup distribution of *L. pneumophila* isolates at the four studied sites depending on the distance from the source of the River Loire.

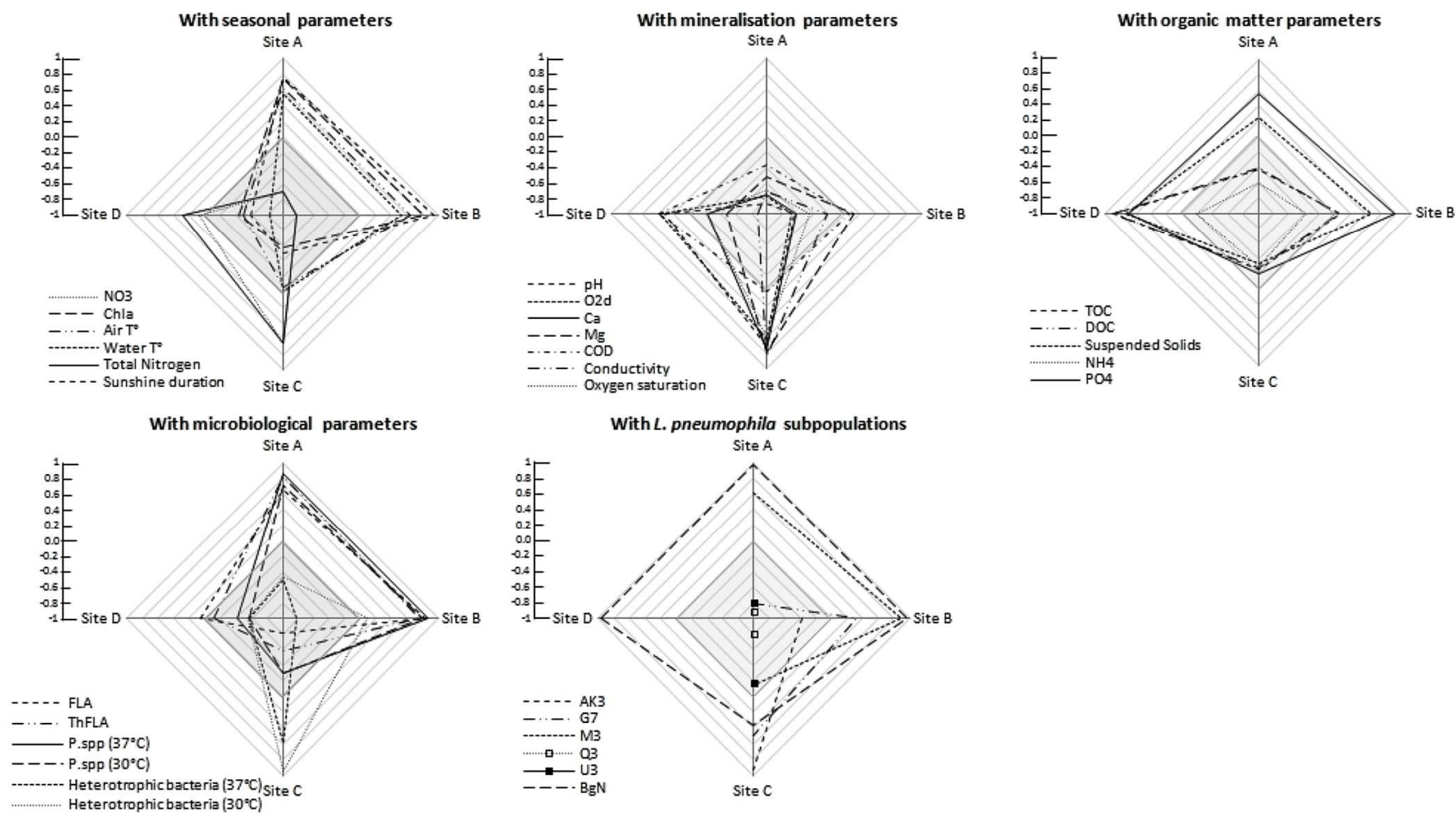
FIGURE 5



nMDS analysis, based on the Bray Curtis index (Kruskal stress = 0.1974), of the *L. pneumophila* community composition between sites and sampling dates.

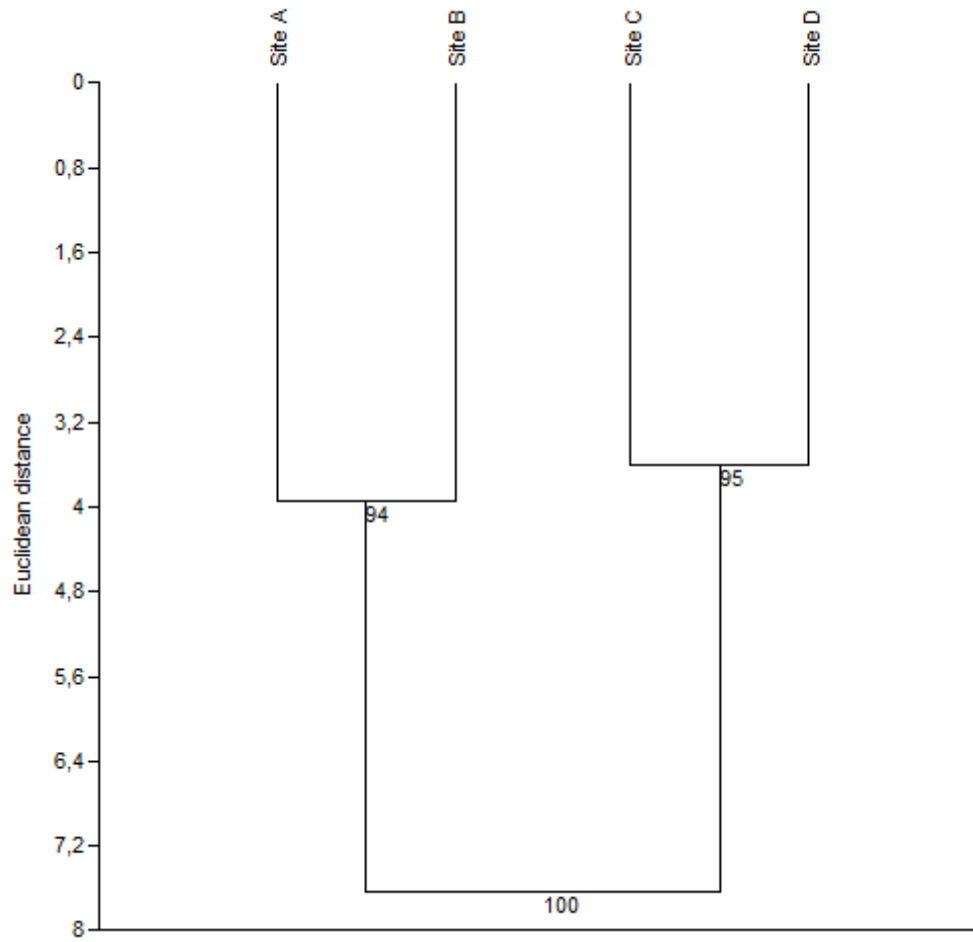
FIGURE 6

Pearson coefficient values between [Lp] concentration and environmental factors



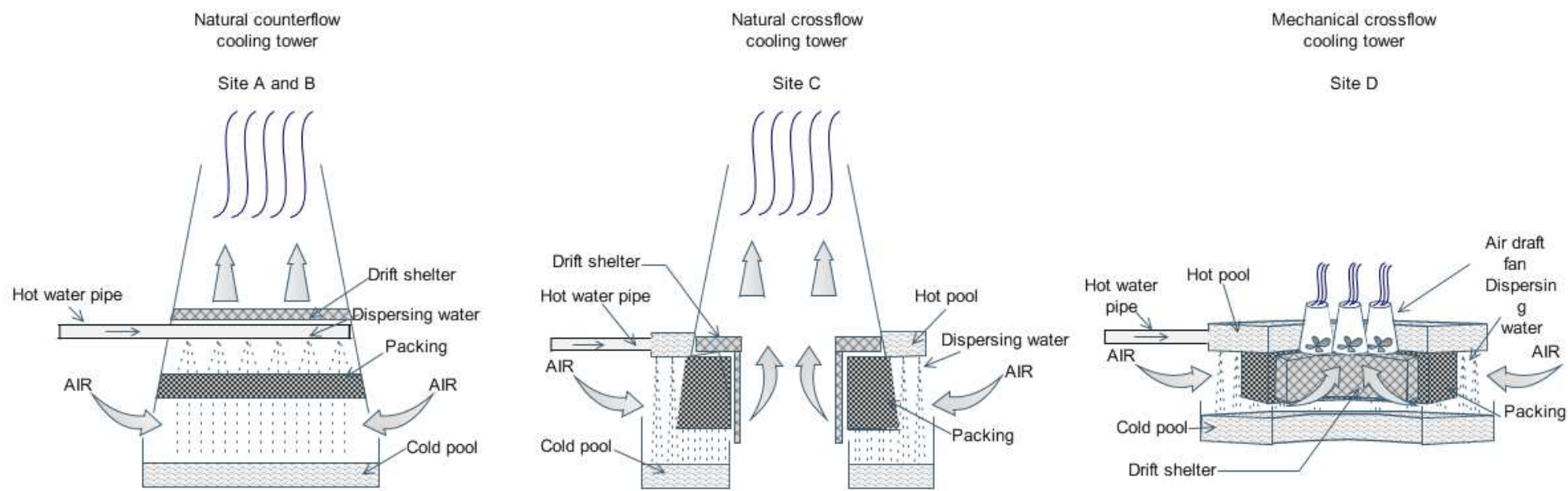
Pearson coefficient values between *L. pneumophila* concentrations, determined for each sample using the culture method, and various environmental factors.

FIGURE 7



Hierarchical clustering diagram constructed using the Euclidean distance and Ward's algorithm, based on Pearson values between *L. pneumophila* concentrations and various environmental factors.

FIGURE 8



Cooling tower structures encountered at the four studied sites.

ARTICLE 4:

***THE IMPACT OF MONOCHLORAMINE ON THE DIVERSITY AND
DYNAMICS OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* SUBPOPULATIONS IN
A NUCLEAR POWER PLANT COOLING CIRCUIT***

**Delphine Jakubek, Matthieu Le Brun, Gérard Leblon, Michael
DuBow, Marie Binet**

Soumis pour publication, *FEMS Microbiology Ecology*

PRESENTATION DU TRAVAIL

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE ET METHODOLOGIE

Plusieurs CNPE du parc nucléaire français sont traités à la monochloramine pour limiter la prolifération de micro-organismes pathogènes tels que les légionelles ou les amibes. Cependant, malgré une efficacité avérée pour maintenir les taux de concentration en légionelles en dessous de la limite de détection de la méthode de dénombrement par culture, des isolats sont toujours détectés en période de traitement et des recolonisations rapides des CRF sont observés après arrêt des traitements. Pour comprendre ces phénomènes, l'effet de la monochloramine sur les populations de légionelles présentes dans les CRF traités a été étudié sur le CNPE de St Laurent où un traitement à la monochloramine a été utilisé sur la période estivale. Cette étude permet, entre autre, d'identifier des sous-populations persistantes pendant la durée du traitement à la monochloramine.

2. RESULTATS

Cette étude confirme l'efficacité biocide anti-*Legionella* de la monochloramine. Différentes sous-populations persistent tout de même pendant l'utilisation du traitement et une rapide recolonisation des CRF par un nombre important de sous-populations est observée 15 jours après la fin du traitement. La communauté de *L. pneumophila* est fortement perturbée par l'ajout de la monochloramine. Alors qu'avant le traitement, la communauté présente une forte richesse et une importante uniformité entre sous-populations, l'ajout du biocide entraîne une chute du degré de diversité au profit d'une forte dominance par une unique sous-population. Cependant, la perturbation de la communauté semble transitoire puisque suite à l'arrêt du traitement, la communauté de *L. pneumophila* retrouve sa structure initiale, bien que sa composition soit significativement différente. La communauté de *L. pneumophila* semble donc être capable de résilience bactérienne. Cette résilience est temporaire, la communauté de *L. pneumophila* évolue, suite à l'arrêt du traitement, probablement sous l'effet de paramètres de saison.

La réapparition de sous-populations après la phase de traitement peut être expliquée par la présence de biofilm ou leur entrée dans un état VBNC pendant l'utilisation du traitement, qui les protège des conditions stressantes générées par le biocide. Lorsque les conditions redeviennent favorables (après l'arrêt du traitement), ces sous-populations redeviennent cultivables et sont à nouveau détectées. Une autre hypothèse pouvant expliquer la persistance et l'apparition de nouvelles sous-populations pendant la phase de traitement est la sélection de souches naturellement plus tolérantes au biocide, qui profitent de la perturbation de la communauté de *L. pneumophila* par le traitement pour s'implanter dans la communauté.

Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique sous forme d'article (présenté ci-dessous) qui est en cours de préparation. Cette publication est en cours de soumission auprès du journal *FEMS Microbiology Ecology*.

**THE IMPACT OF MONOCHLORAMINE ON THE DIVERSITY AND DYNAMICS OF
LEGIONELLA PNEUMOPHILA SUBPOPULATIONS IN A NUCLEAR POWER PLANT
COOLING CIRCUIT**

Delphine Jakubek^{a,b*}, Matthieu Le Brun^a, Gérard Leblon^b, Michael DuBow^b and Marie Binet^a.

^aEDF R&D, Département LNHE, 6, quai Watier, 78400 Chatou, France – ^bUniv Paris-Sud, Institut de Génétique et de Microbiologie, CNRS UMR 8621, Bâtiment 409, 91405 Orsay cedex, France

* Corresponding author:

Delphine Jakubek
EDF R&D
Laboratoire National Hydraulique et Environnement
6 quai Watier
78400 Chatou, France
Email: delphine.jakubek@edf.fr;
Tel: + (33)130877519;
Fax: + (33)130877336.

KEYWORDS: *Legionella pneumophila*, Dynamics, IRS-PCR, Water cooling circuit, Monochloramine, Disinfection

RUNNING TITLE: Monochloramine impact on the ecology of *Legionella*

ABSTRACT

Members of the pathogenic *Legionella* genus encounter suitable growth conditions in nuclear power plant cooling circuits. To limit its proliferation and ensure that levels remain below regulatory thresholds, chemical treatment with monochloramine can be used in continuous or sequential conditions. The aim of this study was to determine the impact of monochloramine on *L. pneumophila* subpopulations in the cooling circuits of a nuclear power plant. The chosen procedure involved monitoring the diversity and dynamics of *L. pneumophila* subpopulations every month over the course of a year in a nuclear power plant cooling circuit, which was treated for two months during the period under study. This study confirmed the effectiveness of monochloramine to limit *L. pneumophila* concentrations in cooling circuits. The culturable *L. pneumophila* community was strongly affected by the injection of monochloramine. Several subpopulations persisted during treatment at low concentrations (below the detection limit of standard methods), suggesting that the susceptibility of *L. pneumophila* is strain-dependent. Although the composition of the subpopulations was not similar, the resilience of the community structure was observed. Indeed, the community eventually returned to its initial structure and presented a similar pattern of richness, diversity and uniformity to that seen before treatment.

INTRODUCTION

Legionella pneumophila is the causative agent of Legionnaires' disease and is responsible for more than 98% of cases in France. Bacteria of the genus *Legionella* are hydrotelluric and are found in natural as well as in artificial aquatic environments. The most frequently identified sources of legionellosis cases are hot water system networks, air conditioning systems and cooling towers (Che, *et al.*, 2011).

The cooling circuits in nuclear power plants are considered to be the largest cooling systems in terms of their dimensions (volume and flow rates). In France, these systems are fed by water from natural sources such as rivers, which, after flowing through the cooling circuit, is then discharged back into the environment. Bacteria can encounter suitable conditions for their survival and growth in nuclear power plant cooling circuits. Although circuit design is not conducive to the development of *Legionella* (due to water velocities, few backwaters, etc.), the presence of nutrients (from suspended solids, organic matter, etc.), favourable growth temperatures (30 to 50°C for hot parts and 18 to 38°C for cold parts), the presence of oxygen, and the presence of biofilm and protozoa can provide a favourable environment for the development of *Legionella* bacteria. However, the nuclear power plant cooling towers in France have never been implicated in legionellosis cases. To prevent possible *Legionella* infections, regulatory monitoring of *Legionella* concentrations in nuclear power plant cooling circuits has been enforced in France since 2004. This regulatory control involves counting culturable *L. spp* and *L. pneumophila* using the French Standard methodology followed by serogroup determination (1 or 2 to 14) by latex agglutination. If the concentration ratios are higher than the regulatory thresholds, corrective action is taken. Thus, in some cooling circuits, a chemical treatment is used to limit *Legionella* proliferation and to ensure that the concentration is maintained below the authorised thresholds. In these cases, the treatment used is the continuous or sequential injection of a chlorinated biocide, monochloramine.

Monochloramine treatment is effective in reducing *Legionella* colonisation in water systems (Flannery, *et al.*, 2006), as well as in nuclear power plant cooling circuits (unpublished data). In such systems, monochloramine used at a concentration of 0.20 ± 0.05 mg/l is able to reduce culturable *Legionella* concentrations to below the enumeration method's detection limit (500 CFU/l). The mode of action of monochloramine on bacterial cells is almost unknown. Laboratory studies have shown that monochloramine inactivates bacterial cells by interacting with the cell envelope and by creating DNA damage. The first reaction appears to be the inhibition of protein-associated biological activities, *e.g.* bacterial transport, respiration and substrate dehydrogenation (Jacangelo, *et al.*, 1991). The survival of *Legionella* bacteria in water systems during treatment could be linked to the presence of protozoa. These interactions allow *Legionella* to persist for long periods of time in the presence of biocide (Thomas, *et al.*, 2004, Alleron, *et al.*, 2008). Many studies have shown the protective effect of amoebae on *Legionella* during treatment. Thomas, *et al.* (2004) suggested that amoebae, and more specifically *Acanthamoeba* spp., can act as reservoirs for *L. pneumophila* and allow the quick re-colonisation of water systems once treatment is interrupted.

However, a recent study performed by Dupuy, *et al.* (2011) showed that the effectiveness of monochloramine was similar on free and intra-cellular forms of *L. pneumophila*. It suggested that monochloramine has a different mode of action compared to other chlorine-based disinfectants. Biofilms are suspected to be the primary source of micro-organisms in drinking water distribution systems. It has been shown that disinfection with biocides, such as chlorine dioxide and chlorite, can reduce the concentration of planktonic bacteria, but is ineffective against biofilm bacteria. Cooper & Hanlon (2010) showed that *L. pneumophila* biofilms were able to survive chlorine treatment at a concentration of 50 mg/l. However, monochloramine has a better penetration into biofilms than free chlorine (Lin, *et al.*, 2000). Studies performed by Kool, *et al.* (1999) have shown that hospital water systems treated with monochloramine are less contaminated by *Legionella* bacteria than those treated with free chlorine. Other studies have suggested that the effectiveness of disinfection could be influenced by microbial community diversity and, in turn, that microbial diversity could be influenced by a disinfection strategy (Berry, *et al.*, 2006). For example, Pryor, *et al.* (2004) performed a study on biofilms from a water distribution system and showed that the use of monochloramine induces a stronger decrease in *Legionella* diversity than free chlorine.

The present study was performed with the aim of better understanding the impact of monochloramine treatment used on the *L. pneumophila* community in nuclear power plant cooling circuits, and increasing our knowledge of the behaviour of these populations during disinfection. To meet this goal, it was necessary to establish the diversity and dynamics of the *L. pneumophila* subpopulations during treatment and to compare them with those observed before and after the treatment periods. The chosen method involved regularly monitoring the *L. pneumophila* subpopulations in water for a one-year period in a nuclear power plant cooling circuit. The investigated cooling circuit was subject to continuous monochloramine treatment for two months during the study period. Thus, it was possible to establish the diversity and dynamics before, during and after treatment in real conditions. To our knowledge, this is the first time that such a study has been performed in a cooling circuit characterised by its very large dimensions and its natural source of cooling water (river).

MATERIALS AND METHODS

STUDY SITE AND SAMPLE COLLECTION

The studied nuclear power plant cooling circuit is located on the River Loire in France, at approximately 520 km from its source, downstream from Orléans (Figure 1). This power plant has two electricity production units, each with a power of 900 MW.

Water was sampled from the cold basin of Unit 1, upstream from the recirculating water pumps, where water mixing occurs to the greatest extent. Samples were collected monthly for one year, from March 2010 to March 2011, except in July when the unit was shut down for maintenance. Monochloramine treatment began on 30 July and ceased on 25 September, 2010. Monochloramine was injected to maintain a continuous concentration of 0.20 ± 0.05 mg/l. Samples were named L1-MAR10 to L1-MAR11 and were treated in a mobile laboratory on the day of collection or stored at 4°C for analysis 24 hours later.

PARAMETERS MEASURED

A set of physicochemical and microbiological parameters was measured for this study. Among these, the water and air temperatures, pH, conductivity, oxygen saturation and dissolved oxygen concentration were measured immediately during the sampling time. An external laboratory (Ianesco, Poitiers) then performed different chemical analyses according to French Standard methodologies: the concentrations of total and dissolved organic carbon (TOC, DOC), calcium and magnesium, biological and chemical oxygen demand, suspended solids (SS), nitrate, nitrite, ammonium, Kjeldahl nitrogen, phosphate and chlorophyll a.

The microbiological analyses involved determining the concentrations of different microorganisms using standard culture methods: *L. pneumophila*, *Pseudomonas* spp., total heterotrophic bacteria and thermophilic or non-thermophilic free-living amoebae (FLA or ThFLA). Procedures used to determine their concentrations have been previously described (Jakubek et al., submitted) and performed in EDF laboratories.

IDENTIFICATION OF CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* SUBPOPULATIONS

A set of physicochemical and microbiological parameters was measured for this study. Among these, the water and air temperatures, pH, conductivity, oxygen saturation and dissolved oxygen concentration were measured immediately during the sampling time. An external laboratory (Ianesco, Poitiers) then performed different chemical analyses according to French Standard methodologies: the concentrations of total and dissolved organic carbon (TOC, DOC), calcium and magnesium, biological and chemical oxygen demand, suspended solids (SS), nitrate, nitrite, ammonium, Kjeldahl nitrogen, phosphate and chlorophyll a.

The microbiological analyses involved determining the concentrations of different microorganisms using standard culture methods: *L. pneumophila*, *Pseudomonas* spp., total heterotrophic bacteria and thermophilic or non-thermophilic free-living amoebae (FLA or ThFLA). Procedures used to determine their concentrations have been previously described (Jakubek et al., submitted) and performed in EDF laboratories.

STATISTICAL ANALYSES

For each sample, the sampling representativeness of the culturable *L. pneumophila* community was validated by calculating the sample coverage rate $\hat{C}$ (Good, 1953) and confirmed by rarefaction curves. The diversity indices used for this study were the Chao1 species richness estimator, the Shannon diversity index and the Pielou equitability index.

Statistical analyses were performed using the non-parametric Multi-Dimensional Scaling (nMDS) test associated with the Bray Curtis index and Principal Component Analysis (PCA) with the Pearson correlation coefficient. Kruskal-Wallis and ANOSIM tests (analysis of similarities) were also used to determine whether *L. pneumophila* community compositions were statistically different between treatment periods and samples. All the statistical tests were performed using the Past software, version 2.01.

RESULTS

VALIDATION OF THE SAMPLING EFFORT NEEDED TO ENSURE A CORRECT REPRESENTATIVENESS OF THE CULTURABLE *L. PNEUMOPHILA* COMMUNITY

Among the 11 water samples collected, seven were representative of the diversity of the culturable *L. pneumophila* community (Table 1). Before treatment, only the sample L1-JUN10 was representative. Among the 85 strains identified by IRS-PCR, 31 subpopulations were detected, which gave a sample coverage rate of 0.835. During treatment, the sample collected in August did not permit the isolation of sufficient strains to ensure a correct representation. In September, although only 14 strains were isolated, the sample coverage rate was 0.786. However, the rarefaction curve showed that representativeness was not obtained, so precautions were taken with regard to the use of this sample (data not shown). After treatment, six samples were collected. All of them, except the sample collected in December, provided sample coverage rates above 0.750 and the rarefaction curves reached the plateau indicating that correct representativeness was obtained (data not shown).

IMPACT OF MONOCHLORAMINE ON MICROORGANISM CONCENTRATIONS

The implementation of monochloramine treatment in the cooling circuit resulted in a general decrease in microorganism concentrations, with the exception of the free-living amoebae (Figure 2). Indeed, heterotrophic bacteria colonisation rates showed the greatest decrease, with a loss of 1.82 log units in June, in the sample collected a few weeks before treatment, and at the end of treatment in September, in the last sample collected during disinfection. Culturable *L. pneumophila* concentrations saw the second largest decrease of 1.67 log units, followed by *Pseudomonas* spp. concentrations, which decreased by 1.55 log units. Although concentrations of culturable *L. pneumophila* were low ($< 10^3$ CFU/l) in the presence of biocide, bacteria were still detectable in water. With regard to the free-living amoebae (thermophilic and non-thermophilic), the injection of monochloramine into the water system did not appear to have an impact on concentration rates. The concentration of FLA remained stable despite the presence of biocide, whereas the concentration of ThFLA showed a slight increase of 0.96 log units. However, after the treatment was interrupted, their concentrations consistently decreased until December. The reverse phenomenon was observed in the concentration rates of the other microorganisms measured. The cooling circuit was re-colonised by all of the culturable bacterial flora, *Pseudomonas* spp. and *L.*

pneumophila, as normally observed after the end of biocide treatment. The decrease in amoebae concentrations, without biocide, from the autumn season until late winter is a known phenomenon, which has been observed annually since the establishment of amoebae concentration monitoring in nuclear power plant cooling circuits (unpublished data).

IMPACT OF MONOCHLORAMINE ON *L. PNEUMOPHILA* DIVERSITY

Culturable *L. pneumophila* populations displayed a high degree of diversity during the studied period (Table 1). Among samples which were representative of the diversity, the number of subpopulations detected per sample varied between six and 35. On average, the richness of the estimated subpopulations was 30 ± 15 and showed a strong annual coefficient of variation of 51%. These results were consistent with those observed in a previous study performed at another power plant (Jakubek et al., submitted). The Shannon index, representing both richness and subpopulation abundance, also showed a strong annual coefficient of variation of 48% during the period studied. The community structure, represented by the Pielou index, saw a lower but still substantial annual variation with a coefficient of variation of 33%.

A PCA analysis was performed and showed that the introduction of monochloramine into the cooling circuit caused a loss of diversity and had a significant effect on the *L. pneumophila* community structure (Figure 3). Indeed, between samples collected before and during treatment, the Pielou index decreased from 0.9243 to 0.8193, suggesting that there was a greater dominance of one or more subpopulations during the treatment period. Richness and diversity estimators decreased and the estimated number of subpopulations fell by 87%, reducing the number of subpopulations to six, detected in September. Samples collected in October, 15 days after the end of treatment, showed a population richness, diversity and structure similar to those observed in June before treatment. From November to March 2011, the culturable *L. pneumophila* community showed a decrease in diversity and an increase in dominance. In March (six months after the end of treatment), the diversity and uniformity of the community seemed to increase again. The observed dynamics was possibly caused by seasonal effects, though this cannot be confirmed because of the absence of an untreated control circuit.

Correlation tests based on the Pearson coefficient were performed on the seven representative samples, to investigate links between *L. pneumophila* diversity and environmental parameters (Figure 4). These tests showed that the degrees of richness and diversity were linked to the *Pseudomonas* spp. concentration. A low degree of *L. pneumophila* diversity was observed when the cooling circuit was only slightly contaminated with culturable *Pseudomonas* spp. and, in turn, when the *L. pneumophila* community was highly diversified, *Pseudomonas* spp. concentration rates were high. In addition, these tests highlighted a negative link between the richness index and the pH, and between the equitability index and the nitrate concentration.

IMPACT OF MONOCHLORAMINE ON THE COMPOSITION OF THE *L. PNEUMOPHILA* COMMUNITY

An nMDS analysis based on the Bray Curtis index was performed on the relative abundance of culturable *L. pneumophila* subpopulations (Figure 5) isolated from all samples collected for this study (except the sample collected in August in which only one strain was isolated).

This analysis highlighted a significant difference between community compositions before, during and after treatment. An ANOSIM test (10,000 permutations, based on three groups formed by the relative abundance of subpopulations detected before, during and after treatment) was performed to confirm this result. With an R value of 0.6975 and a p-value of 0.0076, the test confirmed that the compositions of the *L. pneumophila* subpopulations before, during and after treatment were statistically different.

Before treatment, the culturable *L. pneumophila* community presented a high degree of diversity and significant uniformity. The community was only composed of minority subpopulations (<10% of the *L. pneumophila* community). The *L. pneumophila* concentration was 700 CFU/l with subpopulations whose relative abundance varied between 10 and 70 CFU/l. During this period, a total of 47 subpopulations were detected. Five of them were also detected by culture during treatment, and four after treatment (Figure 6). During treatment, two undetected subpopulations appeared (named H2 and J5) and persisted after treatment. After the interruption of the monochloramine treatment, 16 subpopulations, found to be present before but not during treatment, were detected again (representing 34% of all subpopulations present before treatment). After treatment, 39 new subpopulations appeared. These were not detected either before or during the treatment periods. In October, the culturable *L. pneumophila* community was only composed of minority subpopulations whose relative abundance varied between 40 and 300 CFU/l for an *L. pneumophila* concentration of 3,300 CFU/l. These subpopulations displayed high uniformity and low abundances (<10%). The community structure, but not its composition, at this point was similar to that observed before treatment, in June. A radical change occurred in the *L. pneumophila* community from October. The Kruskal-Wallis test showed significant differences between the composition of the *L. pneumophila* community observed in October and that observed from November (*p-value* < 0.05 between samples collected in October and all other samples collected from November 2010). Indeed, from November, three different subpopulations (AW15, AW5 and U5, see Figure 6) became dominant and their cumulative abundance represented up to 70% of the community. Among these three subpopulations, AW5 seemed to be more dominant than the other two. As the AW5 subpopulation dominated the entire community, it could represent up to 79% of the *L. pneumophila* community. This dominance by one subpopulation seemed to fade in March 2011, when others, already present, saw their abundance increase to become the majority.

DISCUSSION

To our knowledge, this study is one of the first dealing with the diversity and dynamics of *L. pneumophila* subpopulations after treatment by monochloramine in a nuclear power plant cooling circuit. Although numerous studies have been interested in demonstrating the effectiveness of monochloramine in reducing *Legionella* colonisation in water systems (Lin, *et al.*, 2000, Flannery, *et al.*, 2006), few of them have focused on the impact of the biocide on their ecology.

This study was based on the monthly monitoring of *L. pneumophila* subpopulations for a period of one year in a nuclear power plant cooling circuit periodically treated with continuous monochloramine. It was performed by determining the *Legionella* concentrations and identifying the culturable *L. pneumophila* subpopulations using a molecular typing method, IRS-PCR. Firstly, as demonstrated by numerous studies, the

monochloramine treatment was effective in controlling culturable *Legionella* colonisation rates in the cooling circuit. Although *Legionella* bacteria were still detectable, the biocide resulted in a decrease of *Legionella* concentrations, below the enumeration method's detection limit for this type of water (500 CFU/l). A rapid re-colonisation was observed after the end of the disinfection treatment. Fifteen days after the end of treatment, colonisation rates were multiplied by a factor of 200. This rapid and high re-colonisation is usually observed and is normally expected in this type of circuit. Moreover, several culturable *L. pneumophila* subpopulations, already present before the monochloramine treatment was introduced, were still detectable during treatment and/or were also isolated after the end of treatment. The presence of *Legionella* bacteria in low concentrations (below the detection limit) in water systems treated with different biocides is well documented (Scaturro, *et al.*, 2007, Casini, *et al.*, 2008, Cooper, *et al.*, 2008, Garcia, *et al.*, 2008). Several survival strategies have been highlighted to explain the presence of *Legionella* bacteria in the presence of biocide and the quick re-colonisation of water systems. Biofilms and protozoa seem to protect bacteria against biocide treatment and improve their survival (Thomas, *et al.*, 2004, Berry, *et al.*, 2006, Alleron, *et al.*, 2008, Cooper & Hanlon, 2010). In laboratory studies, biocides, such as monochloramine, also induce a viable but non-culturable state, a form of low metabolic activity (Alleron, *et al.*, 2008). Even though these results were obtained from laboratory experiments, they strongly support the idea that VBNC *Legionella* could represent a large proportion of bacteria in man-made environments (Thomas, *et al.*, 2004, Alleron, *et al.*, 2008). Such phenomena could explain the presence and reappearance of several culturable *L. pneumophila* subpopulations during and after treatment. *L. pneumophila* subtypes, regardless of the molecular method used for their identification, could persist over long periods under treatment in hospital water systems (Scaturro, *et al.*, 2007, Casini, *et al.*, 2008). A set of RAPD subtypes was also found to persist in a domestic shower system, despite repeated cycles of chlorination at 50 mg/l (Cooper, *et al.*, 2008). Garcia, *et al.* (2008) demonstrated that the persistence of *L. pneumophila* subtypes in the presence of biocide, determined by PFGE and AP-PCR methods in chlorinated facilities, seemed not to be the result of a decrease in *Legionella* susceptibility to chlorine. Persistent *L. pneumophila* subtypes in treated installations remained sensitive to disinfectant (Garcia, *et al.*, 2008) and their susceptibility remained unchanged over time (Casini, *et al.*, 2008).

Berry, *et al.* (2006) suggested that microbial diversity could influence the effectiveness of disinfection and pathogen survival in drinking water distribution systems. Their conclusions were based on various studies, which showed that microbial diversity is affected by the disinfection strategy (Williams, *et al.*, 2004 Simoes, 2010 #50, Simoes, *et al.*, 2010) and that multi-species biofilms are more resistant to biocides than single-species biofilms (Elvers, *et al.*, 2002). By analysing the structure of the culturable *L. pneumophila* community at different stages of treatment, our study shows that the monochloramine treatment induced a change in the *L. pneumophila* subpopulations. Before the treatment was introduced, the *L. pneumophila* community was characterised by a high richness and diversity. It was composed of only minority subpopulations, which gave a uniform structure to the community. Monochloramine induced a loss of richness and diversity and the community presented a higher dominance.

The impacts of biocide on the diversity and dynamics of a specific species are not well documented. However, its effects on the entire microbial community that may be present in a water system have been investigated. These studies agree with the fact that bacterial

diversity is influenced by the disinfection strategy (Pryor, *et al.*, 2004, Williams, *et al.*, 2004, Mathieu, *et al.*, 2009, Roeder, *et al.*, 2010). A shift in the proportions of *Proteobacteria* subclasses is usually observed when a chlorine-based treatment is introduced or when there is a change in the treatment strategy. Thus, Mathieu, *et al.* (2009) have highlighted a link between residual chlorine concentration and the abundance of γ -proteobacteria. An increase in residual chlorine concentration seemed to induce an increase in γ -proteobacteria in biofilms and in the water matrix. Pryor, *et al.* (2004) showed that a shift in treatment strategy, from free chlorine to monochloramine, induced a modification in the composition of *Legionella* populations in water and biofilm samples from a drinking water system. This modification was characterised by a decrease in *Legionella* richness (eight species were detected during free chlorine treatment compared with three during monochloramine use). The authors suggested that the use of biocide treatment induces different selective pressures, which lead to the survival of more tolerant bacteria (Mathieu, *et al.*, 2009, Roeder, *et al.*, 2010).

Treatment seems to have a significant impact on microbial community structure, since the number of similarities between biofilm samples collected before and during treatment, using different biocides, is low (Roeder, *et al.*, 2010), and the population shift seems to be reversible; this is known as the resilience of the bacterial community (Mathieu, *et al.*, 2009). This resilience is characterised by a similar bacterial community structure before and after an environmental disturbance. Although this phenomenon has been observed for proteobacteria subclasses, it could explain the results observed in our study. Indeed, fifteen days after the end of monochloramine treatment, the culturable *L. pneumophila* community displayed the same richness, diversity and uniformity as observed before treatment. However, the community composition was quite different, with 43% of shared subpopulations apparent. More surprisingly, this return of the community structure to its initial state seemed to be transient, possibly because of seasonal effects. Among the 45 subpopulations detected in October, during the following months, three of them showed a strong increase in their relative abundance and could represent 70% of the whole *L. pneumophila* community. Thereafter, one of these became dominant over the other two for several months. PCA analyses and correlation tests did not reveal any information to aid the understanding this phenomenon. The measured abiotic and biotic parameters did not appear to be responsible for this switch.

The open flow of raw water from river through the nuclear power plant cooling circuit could also explain the observed resilience of the *L. pneumophila* community. Indeed, the river water continuously feeds the cooling circuit ecosystem with various microorganisms including *Legionella*. It could have a significant impact on the *L. pneumophila* community structure and composition. A study characterising the dynamics of *L. pneumophila* community in the river water and comparing it with that observed before, during and after a monochloramine treatment process in cooling circuit water would be useful to investigate this hypothesis. As well, the monochloramine susceptibility of the *L. pneumophila* strains encountered during the treatment phases must be analysed and compared to untreated strains. Such studies would add to our knowledge of the impacts of monochloramine on *Legionella* and could be helpful in managing treatment strategies in nuclear power plants contaminated by pathogenic bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Electricité de France (EDF) and from the National Association for Research and Technology (ANRT) which are linked together by an industrial research doctoral training contract (CIFRE).

Emilie Lehericey (EDF R&D) and Gaelle Le-Meur (Ajilon Engineering) are particularly acknowledged for their contribution to the sampling campaigns and to the performance of laboratory tests. We also thank our nuclear power plant partner, Corinne Mounier (EDF DPN), who provided access to the plant and allowed the completion of this study.

REFERENCES

- Alleron L, Merlet N, Lacombe C & Frère J (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* **57**: 497-502.
- Berry D, Xi C & Raskin L (2006) Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr Opin Biotechnol* **17**: 297-302.
- Casini B, Valentini P, Baggiani A, Torracca F, Frateschi S, Nelli LC & Privitera G (2008) Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates following long-term chlorine dioxide treatment in a university hospital water system. *J Hosp Infect* **69**: 141-147.
- Che D, Campèse C & Jarraud S (2011) Légionelles et légionellose : qu'a-t-on découvert depuis 30 ans ? *Pathol Biol (Paris)* **59**: 134-136.
- Cooper IR & Hanlon GW (2010) Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect* **74**: 152-159.
- Cooper IR, White J, Mahenthiralingam E & Hanlon GW (2008) Long-term persistence of a single *Legionella pneumophila* strain possessing the mip gene in a municipal shower despite repeated cycles of chlorination. *J Hosp Infect* **70**: 154-159.
- Dupuy M, Mazoua S, Berne F, et al. (2011) Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res* **45**: 1087-1094.
- Elvers KT, Leeming K & Lappin-Scott HM (2002) Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**: 331-338.
- Flannery B, Gelling LB, Vugia DJ, et al. (2006) Reducing *Legionella* colonization of water systems with monochloramine. *Emerg Infect Dis* **12**.
- Garcia MT, Baladron B, Gil V, et al. (2008) Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *J Appl Microbiol* **105**: 837-847.
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.
- Jacangelo JG, Olivieri VP & Kawata K (1991) Investigating the mechanism of inactivation of *Escherichia coli* B by monochloramine. *Journal AWWA* **83**: 80-87.

- Jakubek D, Le Brun M, Leblon G, DuBow M & Binet M Validation of IRS PCR, a molecular typing method, for the study of the diversity and population dynamics of *Legionella* in industrial cooling circuits. *Lett Appl Microbiol* doi:10.1111/lam.12025.
- Kool JLMD, Bergmire Sweat, H. DMP, *et al.* (1999) Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial Legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**: 798-805.
- Lin Y-sE, Yu VL, Vidic RD & States SJ (2000) Discussion of monochloramine and Legionnaires' disease'. *Journal AWWA* **92**: 88-90.
- Mathieu L, Bouteleux C, Fass S, Angel E & Block JC (2009) Reversible shift in the α -, β - and χ -proteobacteria populations of drinking water biofilms during discontinuous chlorination. *Water Res* **43**: 3375-3386.
- Pryor M, Springthorpe S, Riffard S, Brooks T, Huo Y, Davis G & Sattar SA (2004) Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci Technol* **50**: 83-90.
- Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M & Etienne J (1998) Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* **36**: 161-167.
- Roeder RS, Lenz J, Tarne P, Gebel Jr, Exner M & Szewzyk U (2010) Long-term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms. *Int J Hyg Environ Health* **213**: 183-189.
- Scaturro MP, Dell'Éva IM, Helfer FM & Ricci MÂ LMD (2007) Persistence of the same Strain of *Legionella pneumophila* in the water system of an Italian hospital for 15 years. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**: 1089-1092.
- Simoes LC, Simoes M & Vieira MJ (2010) Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6673-6679.
- Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret J & Lévi Y (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* **97**: 950-963.
- Williams MM, Domingo JWS, Meckes MC, Kelty CA & Rochon HS (2004) Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J Appl Microbiol* **96**: 954-964.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Study site, labelled site L, located on the River Loire (France).

FIGURE 2: Microorganism concentrations determined for each sample using standard laboratory culture methods.

FIGURE 3: Biplot of PCA analyses of culturable *L. pneumophila* diversity indices. Specific richness was measured using the Chao estimator, diversity was measured with the Shannon index and community structure was measured with the Pielou

index. Symbols represent the period when samples were collected (▲ before, ■ during and ● after monochloramine treatment). Separation on the F1 axis represents 82% of the variance, and is composed of approximately the same proportions for the three diversity indices. On the F2 axis, the separation between samples is displayed by the Chao index in one direction and the Pielou index in the other. Separation on the F2 axis represents 17% of the variance. Separation on the F3 axis represents 0.8% of the variance (not shown).

FIGURE 4: Relationship between *L. pneumophila* diversity indices (Chao, Shannon and Pielou) and different environmental parameters, which presented a significant Pearson correlation coefficient.

FIGURE 5: nMDS analyses based on the Bray Curtis index (Kruskal stress = 0.1567) for *L. pneumophila* community composition from samples collected before (▲), during (■) and after (●) monochloramine treatment represented by the 95% ellipse.

FIGURE 6: Diagrams representing shared subpopulations between periods before, during and after monochloramine treatment (a) and the number of culturable *L. pneumophila* strains belonging to each subpopulation detected after treatment (legends representing only subpopulations of interest) (b).

TABLE 1

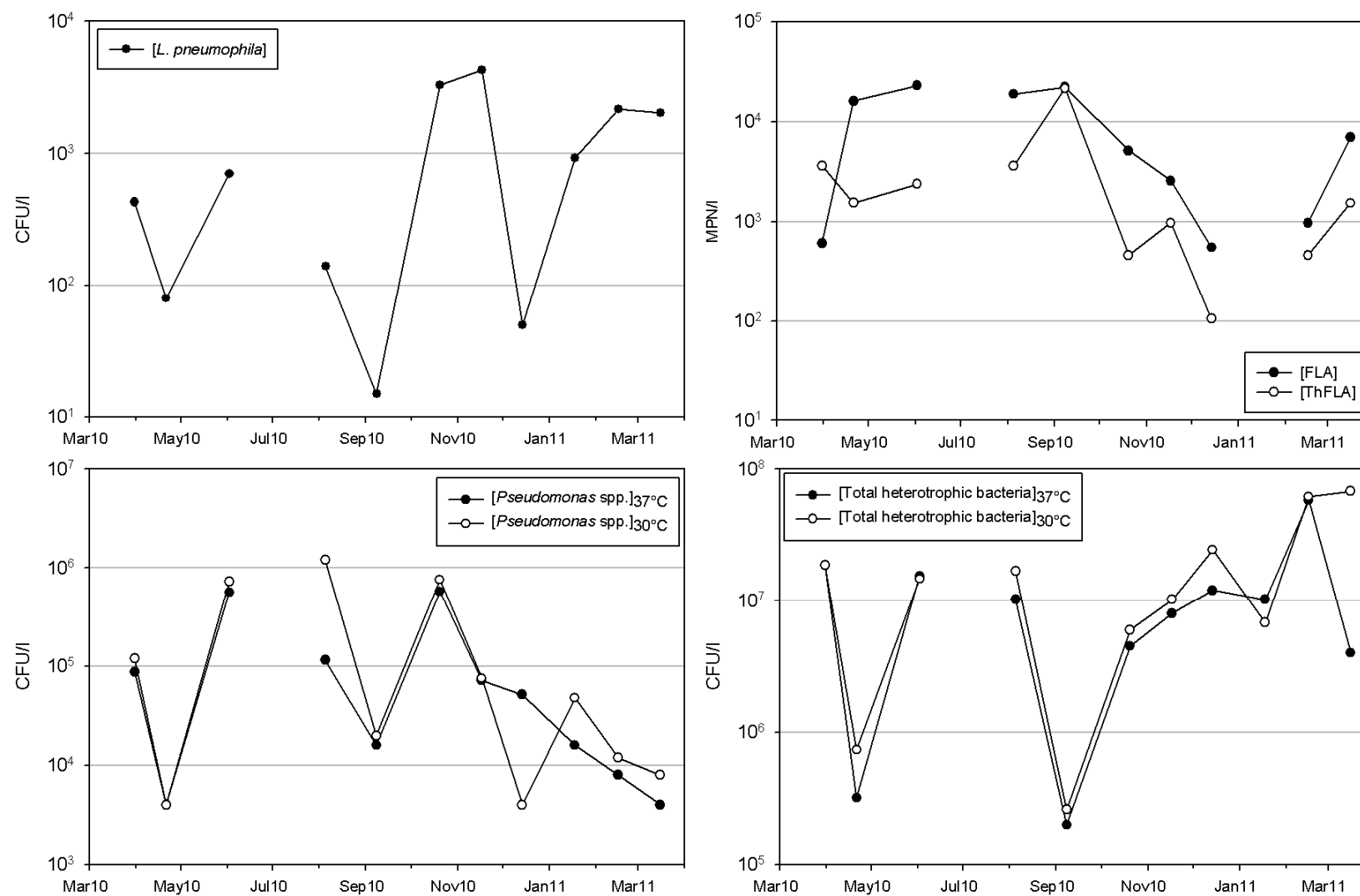
Diversity indices and the confidence intervals of culturable *L. pneumophila* communities collected from the cold basin of a nuclear power plant located on the River Loire.

Sampling date	Monochloramine treatment	$\hat{C}$	Nb of strains typed	Nb of subpopulations detected	Chao	Shannon H	Pielou J
L1-MAR10	Before	0.286	14	12	NA	NA	NA
L1-AVR10	Before	0.684	19	10	NA	NA	NA
L1-JUN10	Before	0.835	85	31	53.80 [37.30 ; 113.40] _{IC95%}	3.174 [3.030 ; 3.318] _{IC95%}	0.9243 [0.8824 ; 0.9662] _{IC95%}
L1-AUG10	During	0.000	1	1	NA	NA	NA
L1-SEP10	During	0.786	14	6	7.00 [6.10 ; 16.70] _{IC95%}	1.468 [1.043 ; 1.893] _{IC95%}	0.8193 [0.5821 ; 1.056] _{IC95%}
L1-OCT10	After	0.865	89	35	41.00 [36.50 ; 58.30] _{IC95%}	3.347 [3.215 ; 3.479] _{IC95%}	0.9415 [0.9043 ; 0.9785] _{IC95%}
L1-NOV10	After	0.901	91	17	35.00 [21.00 ; 98.30] _{IC95%}	2.057 [1.832 ; 2.282] _{IC95%}	0.7260 [0.6466 ; 0.8054] _{IC95%}
L1-DEC10	After	0.550	20	11	NA	NA	NA
L1-JAN11	After	0.873	79	14	25.30 [16.70 ; 61.70] _{IC95%}	1.013 [0.667 ; 1.359] _{IC95%}	0.3838 [0.2527 ; 0.5150] _{IC95%}
L1-FEB11	After	0.929	99	11	18.00 [12.30 ; 47.50] _{IC95%}	0.922 [0.655 ; 1.190] _{IC95%}	0.3846 [0.2732 ; 0.4963] _{IC95%}
L1-MAR11	After	0.905	84	16	30.00 [18.90 ; 83.10] _{IC95%}	2.184 [1.986 ; 2.383] _{IC95%}	0.7878 [0.7163 ; 0.8595] _{IC95%}
Annual coefficient of variation (CV%)					51%	48%	33%

FIGURE 1

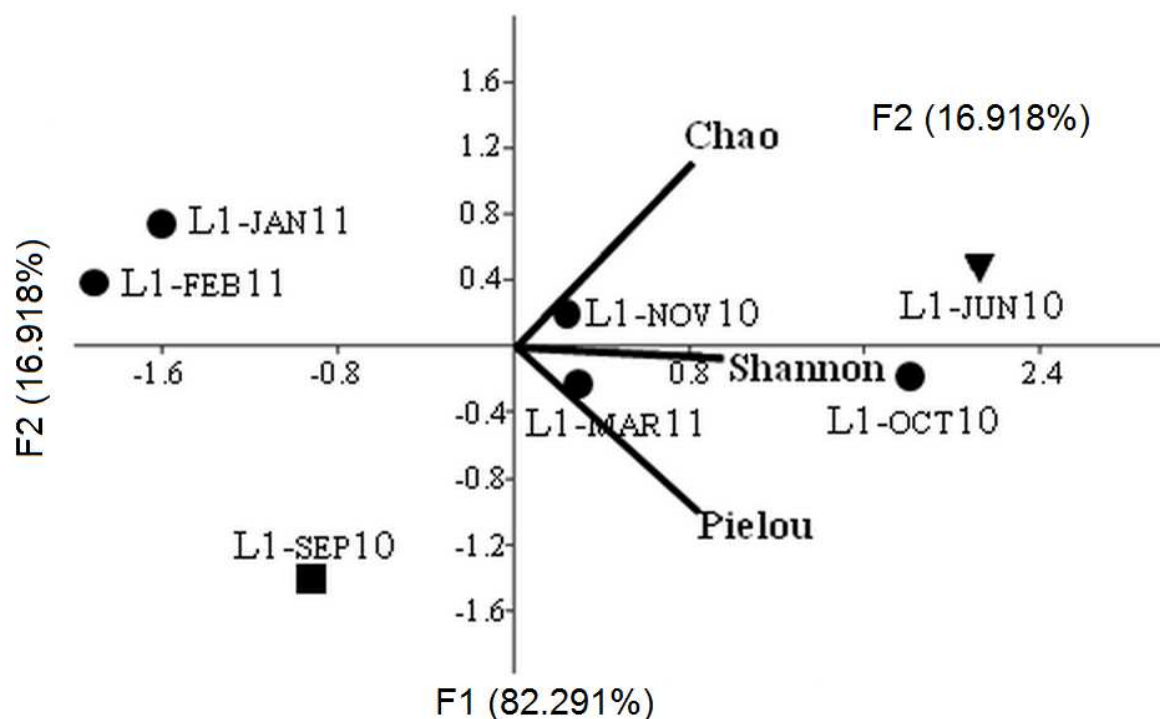


Study site, labelled site L, located on the River Loire (France).

FIGURE 2


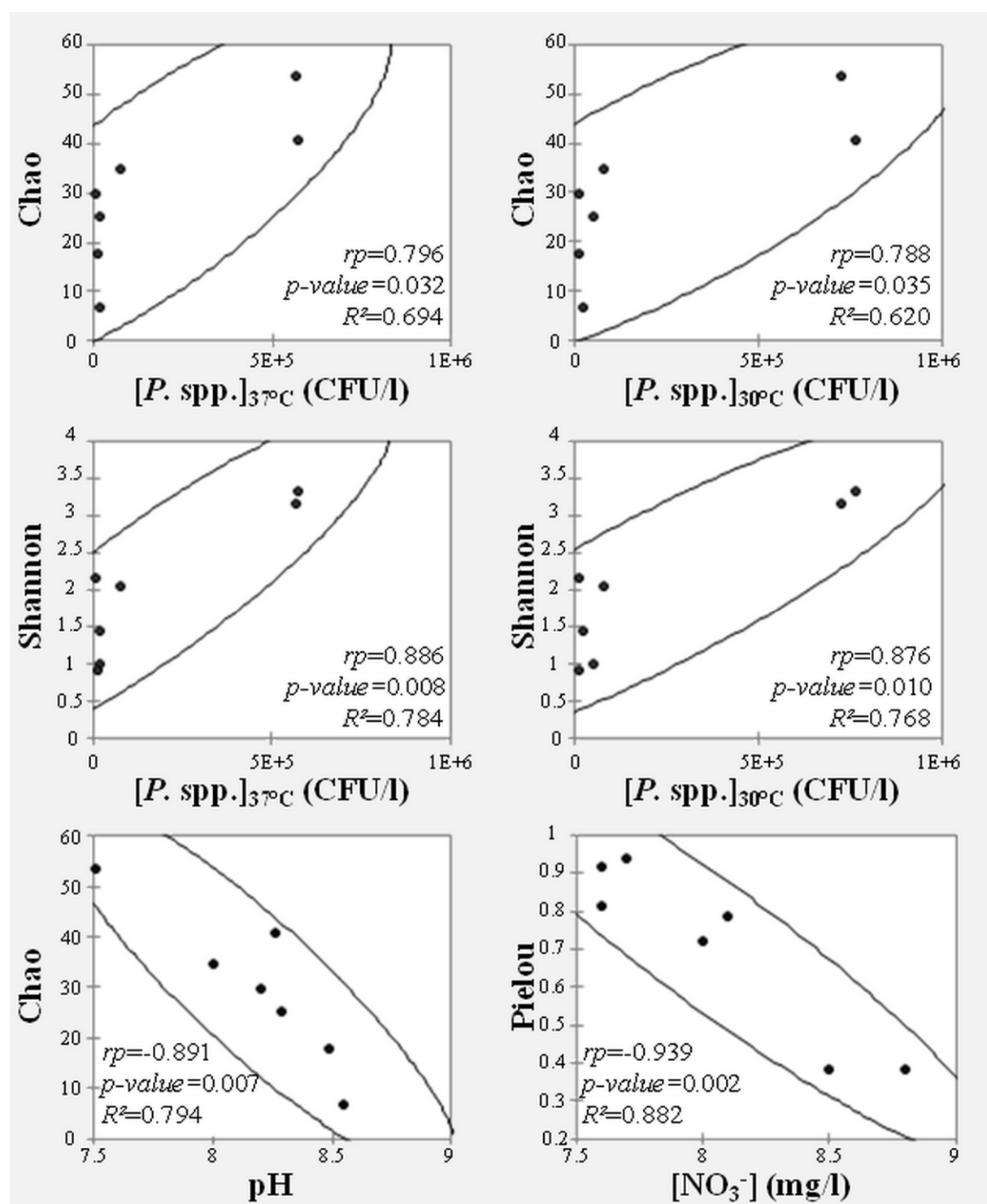
Microorganism concentrations determined for each sample using standard laboratory culture methods.

FIGURE 3



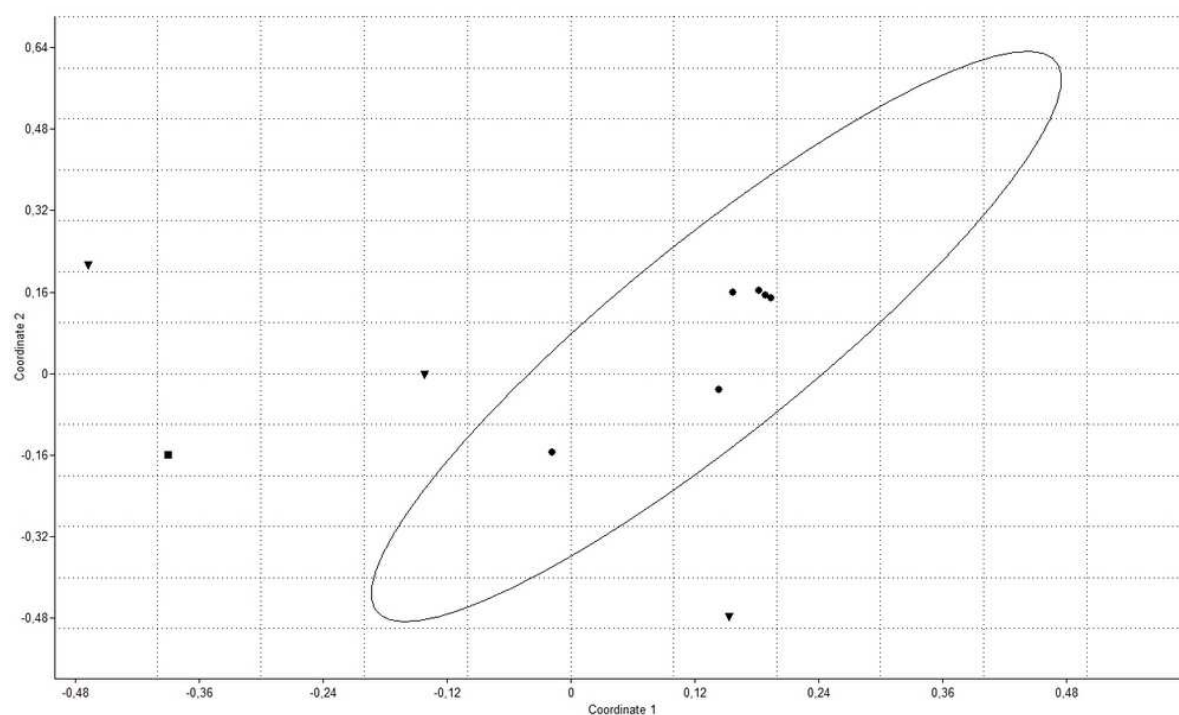
Biplot of PCA analyses of culturable *L. pneumophila* diversity indices. Specific richness was measured using the Chao estimator, diversity was measured with the Shannon index and community structure was measured with the Pielou index. Symbols represent the period when samples were collected (▲ before, ■ during and ● after monochloramine treatment). Separation on the F1 axis represents 82% of the variance, and is composed of approximately the same proportions for the three diversity indices. On the F2 axis, the separation between samples is displayed by the Chao index in one direction and the Pielou index in the other. Separation on the F2 axis represents 17% of the variance. Separation on the F3 axis represents 0.8% of the variance (not shown).

FIGURE 4



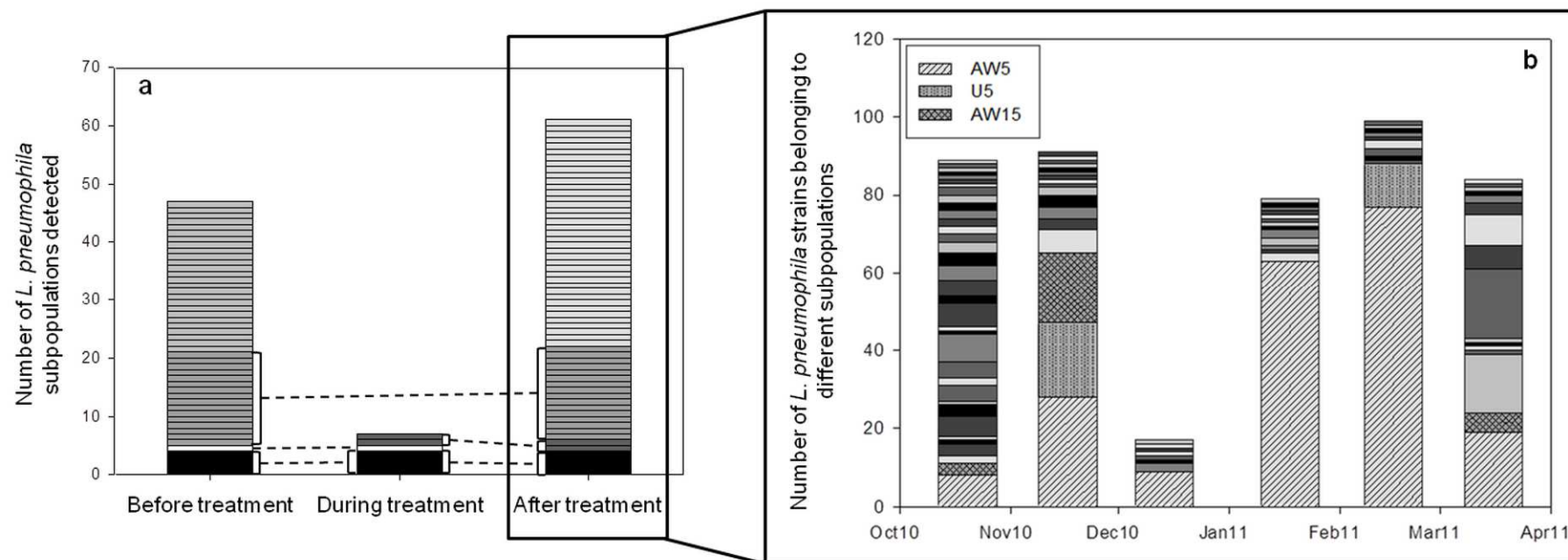
Relationship between *L. pneumophila* diversity indices (Chao, Shannon and Pielou) and different environmental parameters, which presented a significant Pearson correlation coefficient.

FIGURE 5



nMDS analyses based on the Bray Curtis index (Kruskal stress = 0.1567) for *L. pneumophila* community composition from samples collected before (▲), during (■) and after (●) monochloramine treatment represented by the 95% ellipse.

FIGURE 6



Diagrams representing shared subpopulations between periods before, during and after monochloramine treatment (a) and the number of culturable *L. pneumophila* strains belonging to each subpopulation detected after treatment (legends representing only subpopulations of interest) (b).

ARTICLE 5:

*SUSCEPTIBILITY OF LEGIONELLA STRAINS TO THE
CHLORINATED BIOCIDES, MONOCHLORAMINE*

**Delphine Jakubek, Carole Guillaume, Marie Binet, Gérard Leblon,
Michael DuBow, Matthieu Le Brun**

Soumis pour publication, *Microbes and Environments*

PRESENTATION DU TRAVAIL

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE

La persistance des sous-populations pendant l'utilisation de la monochloramine dans les CNPE traités avec ce biocide et la recolonisation rapide des CRF généralement observée après l'arrêt des traitements peuvent être expliquées par une plus grande tolérance de ces souches au biocide chloré. La veille bibliographique réalisée sur ce sujet nous apprend que des résistances cellulaires des légionelles aux biocides chlorés sont très peu probables, notamment par l'absence de cible spécifique des biocides chlorés, mais que, les micro-organismes peuvent développer des mécanismes de résistance environnementales et d'adaptations phénotypiques, qui sont des phénomènes transitoires leur permettant de lutter contre l'agent chimique. De plus, chaque micro-organisme possède des caractéristiques naturelles modulant leur sensibilité aux biocides. D'après la synthèse bibliographique, il apparaît que la sensibilité naturelle des micro-organismes aux biocides chlorés est dépendante de la souche. Pour tenter d'expliquer la persistance de souches de légionelles pendant l'utilisation de la monochloramine dans les CRF et les recolonisations rapides observées après arrêt des traitements, une étude *in vitro* visant à comparer les sensibilités intrinsèques de différentes souches de légionelles a été effectuée.

2. METHODOLOGIE

Les souches de *L. pneumophila* testées ont été sélectionnées en fonction des conditions de traitement lors de leur isolement ainsi que de leur identification moléculaire par IRS PCR. Ainsi, les différentes souches testées proviennent de la rivière, en amont ou aval de CNPE ; de CRF traités ou non de manière continue ou séquentielle à la monochloramine. Les sensibilités de ces souches ont été comparées avec celles de genres bactériens autres que *Legionella* (bactéries à Gram positif et négatif) et avec des légionelles n'appartenant pas à l'espèce *L. pneumophila*. Les sensibilités intrinsèques des souches à la monochloramine ont été évaluées par la mesure du facteur $Ct_{99.9\%}$, produit de la concentration en monochloramine par le temps de contact nécessaire pour abattre 99.9% des bactéries.

En amont de cette étude, le protocole de détermination de la sensibilité naturelle des légionelles à la monochloramine a été développé. Une approche originale a été utilisée pour le développement de ce protocole. Un plan d'expérience a été créé pour déterminer les conditions expérimentales optimales permettant de répondre à différents critères de validation de la méthode.

3. RESULTATS

Il résulte de ces analyses que les souches de *L. pneumophila* isolées des CRF de différents CNPE présentent une grande variabilité dans leur sensibilité à la monochloramine. L'ensemble des souches testées sont sensibles au biocide. Cette étude a permis de mettre en évidence l'absence de lien entre la tolérance de ces souches et les processus de désinfection à la monochloramine dans les CRF. En effet, le traitement à la monochloramine ne sélectionne pas de souches naturellement tolérantes à la monochloramine et les

modalités d'utilisation de ce biocide sont suffisamment efficaces pour abattre 99.9% des souches les plus tolérantes au biocide. Ainsi, la persistance de certaines sous-populations de *L. pneumophila* dans les CRF traités à la monochloramine et la recolonisation rapide des circuits après arrêt des traitements sont des phénomènes qui ne proviennent pas de la sélection par le biocide de bactéries naturellement plus résistantes au traitement. La source de ces phénomènes reste donc en suspens. Les pistes les plus probables pour expliquer ces observations sont la protection physique des bactéries par les protozoaires et les biofilms, ainsi que le statut VBNC qui empêche la détection de ces bactéries par la culture pendant les phases de traitement mais qui retrouvent leur capacité à croître après l'arrêt des traitements.

L'ensemble de ce travail est présenté sous forme d'article dans le paragraphe suivant. Cette publication a été soumise chez *Microbes and Environments*.

En plus de cette publication, d'autres communications ont été réalisées sur ces travaux :

- **deux conférences orales aux congrès SYMPOLEGIO 2011 (congrès international organisé par le CNRL du 15 au 16 Novembre 2011 à Lyon) et aux JOURNEES INFORMATIONS EAUX 2012 (JIE 2012 – congrès national organisé du 25 au 27 Septembre 2012 par l'APTEN à Poitiers) ;**
- **un poster au congrès JOURNEES INFORMATIONS EAUX 2012 (JIE 2012 – congrès national organisé du 25 au 27 Septembre 2012 par l'APTEN à Poitiers).**

SUSCEPTIBILITY OF *LEGIONELLA* STRAINS TO THE CHLORINATED BIOCIDES, MONOCHLORAMINE

Delphine Jakubek^{a,b,*}, Carole Guillaume^c, Marie Binet^a, Gérard Leblon^b, Michael DuBow^b and
Matthieu Le Brun^a

^aEDF R&D, Département LNHE, 6, quai Watier, 78400 Chatou, France

^bUniv Paris-Sud, Institut de Génétique et de Microbiologie, CNRS UMR 8621,
Bâtiment 409, 91405 Orsay cedex, France

^cEuro Engineering, Énergie-Environnement, 22 terrasse Bellini, 92800 Puteaux, France

(D. Jakubek and C. Guillaume contributed equally to this work)

* Corresponding author:

EDF R&D

Laboratoire National Hydraulique et Environnement

6 quai Watier

78400 Chatou, France

Email: delphine.jakubek@edf.fr;

Tel: + (33)130877519;

Fax: + (33)130877336.

TOPIC: This manuscript deals with the ecology of microorganisms in engineered environments and is related to the disinfection treatment impact on microorganisms

RUNNING HEADLINE: *Legionella* susceptibility to monochloramine

KEYWORDS: *Legionella*, Water cooling circuit, Monochloramine, Disinfection, Biocide

ABSTRACT

Members of the *Legionella* genus find suitable conditions for their growth and survival in nuclear power plant cooling circuits. To limit the proliferation of the *Legionella* pathogenic bacteria in nuclear power plant cooling circuits, and ensure that levels remain below regulatory thresholds, a monochloramine treatment can be used. Although the treatment is highly effective, *i.e.* it reduces *Legionella* numbers by over 99%, *Legionella* bacteria can still be detected at low concentrations and a rapid re-colonisation of circuits can occur after the treatment has ceased. The aim of this study was to develop; using an original approach, an *in vitro* methodology for determining the intrinsic susceptibility of *L. pneumophila* strains, collected in various nuclear power plant cooling circuits subjected to different treatment conditions. Measurements were taken using the Ct_{99.9%} factor. The susceptibility of environmental strains varies widely and is, for some strains, greater than that of known tolerant species. However, strain susceptibility was not related to treatment conditions. Selection pressure induced by monochloramine use did not result in the selection of more tolerant *Legionella* strains and did not explain the detection of *Legionella* during treatment or the rapid re-colonisation of cooling circuits after disinfection has ceased.

INTRODUCTION

Legionella pneumophila is the causative agent of Legionnaires' disease and is responsible for more than 98% of legionellosis cases in France (8). Bacteria of the genus *Legionella* are hydrotelluric and are found in natural as well as in artificial aquatic environments. The most frequently identified sources of legionellosis cases are hot water system networks, air conditioning systems and cooling towers (8). Bacteria in nuclear power plant cooling circuits can find suitable conditions for their survival and growth. Although circuit design is not conducive to the development of *Legionella* (due to water velocities, few backwaters, etc.), the presence of nutrients (from suspended solids, organic matter, etc.), favourable growth temperatures (30 to 50°C for hot parts and 18 to 38°C for cold parts), the presence of oxygen, and the presence of biofilms and protozoa can provide a suitable environment for the development of these bacteria. However, the cooling towers in nuclear power plants in France have never been implicated in legionellosis cases. To prevent possible *Legionella* infections, the regulatory monitoring of *Legionella* concentrations in nuclear power plant cooling circuits was established in France in 2004. This regulatory control involves counting culturable *L. spp.* and *L. pneumophila* using the French Standard methodology (3) followed by serogroup determination (1 or 2 to 14) by latex agglutination. If the concentration rates are above the regulatory thresholds, corrective actions, such as disinfection procedures, are required. Thus, in some cooling circuits, a chemical treatment is used to limit *Legionella* proliferation and ensure that the concentration is maintained below the authorised thresholds. In these cases, the treatment used is the continuous or sequential injection of the chlorinated biocide, monochloramine.

Oxidising biocides are characterised by their non-selective attack on microorganisms and by a common chemical feature: production of hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$), which are able to oxidise and mineralise almost any organic molecule, yielding CO_2 and inorganic ions (24). Killing by active chlorine compounds proceeds in three steps: (i) formation of a chlorine cover (*i.e.* covalent N-Cl bonds) on the surface of the microbes, which affects virulence but not viability;

(ii) penetration through cell barriers and (iii) destruction of important cell components, such as proteins responsible for bacterial transport, respiration and substrate dehydrogenation (2, 18). The rate of penetration can vary to a large degree for the same agent. The cell walls of Gram-negative bacteria contain two lipid bilayers, compared to only one in Gram-positive bacteria. As monochloramine is a lipophilic biocide, this suggests that Gram-negative bacteria have a higher susceptibility to monochloramine than Gram-positive bacteria, as demonstrated by Arnitz *et al.* (2). However, the specific mode of action of monochloramine on bacterial cells is not well known. Laboratory studies have shown that monochloramine does not severely damage the cell envelope or affect nucleic acid function; it reacts rapidly with only four amino acids (cysteine, cystine, methionine and tryptophan) and very slowly with DNA or RNA (18). In addition to the reactivity of the oxidant, the physiological state of the bacteria can influence the efficiency of bacterial inactivation (27). Monochloramine treatment is effective in reducing *Legionella* colonisation in water systems (14), such as in nuclear power plant cooling circuits (unpublished data). In these systems, monochloramine, used at a concentration of $0.25 \pm 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$, is able to reduce culturable *Legionella* concentrations to below the enumeration method's detection limit (500 CFU.L^{-1}). However, during disinfection, *Legionella* bacteria can still be detected at low concentrations and rapid re-colonisation in cooling circuits, as in other man-made water systems (11, 16), can be observed after treatment has ceased.

The survival of *Legionella* bacteria in water systems during treatment could be linked, in part, to the presence of protozoa (1, 7, 31). Their interaction allows *Legionella* to persist for long periods of time in the presence of biocide (1, 31). Thomas *et al.* (31) suggested that amoebae act as reservoirs for *L. pneumophila* and allow the rapid re-colonisation of water systems once treatment is interrupted. Biofilms are suspected to be the primary source of micro-organisms in drinking water distribution systems. It has been shown that disinfection with biocides, such as chlorine dioxide and chlorite, can reduce the concentrations of planktonic bacteria, but have little or no effect on the concentrations of biofilm bacteria (15). Cooper *et al.* (11) showed that *L. pneumophila* biofilms were able to survive for 28 days when exposed to chlorine treatment at a concentration of 50 mg.L^{-1} . Another study performed on a pilot-scale water distribution system found that monochloramine did not deter *L. pneumophila* from accumulating in biofilms (21). However, monochloramine, and its low reactivity with biofilm polymers, has a better penetration into biofilms than free chlorine and is, therefore, more effective in eradicating *Legionella* in biofilm (22). Others studies have suggested that disinfection efficacy could be affected by microbial community diversity and, in turn, that the disinfection strategy could influence microbial diversity (7). For example, Pryor *et al.* (26) performed a study on biofilms from a water distribution system and showed that the use of monochloramine induces a larger decrease in *Legionella* diversity than free chlorine, confirming the high efficiency of monochloramine against *Legionella* in biofilm. Another hypothesis that could explain the persistence of *Legionella* in cooling circuits during treatment is the selection, by monochloramine, of *Legionella* strains that are more tolerant to this biocide (16). Although the consensus view is that chlorinated biocide usage does not induce bacterial resistance, the selection of intrinsically-tolerant strains by monochloramine cannot be excluded. Thus, it is necessary to determine the intrinsic susceptibility of *Legionella* strains isolated from cooling circuits, and to compare the susceptibility of strains isolated from non-treated cooling circuits with those from continuously or sequentially treated systems.

To achieve this objective, an *in vitro* approach, based on the Chick and Watson model (10, 33), was developed to determine Ct values, the product of monochloramine concentration and the contact time necessary to observe a 3-log reduction in bacterial concentration. Ct values are directly proportional to bacterial inactivation rates. They represent the susceptibility of bacteria to the biocide in defined experimental conditions. The inactivation rates of bacteria with biocide, and the Ct values, are influenced by experimental parameters. An original approach, using a response surface methodology (RSM) combined with a multifactorial experimental design, was implemented to optimise experimental variables, including temperature, pH, initial bacteria and biocide concentrations. Treating each factor separately would be very time-consuming. Furthermore, if several factors were to play a role, their interactions would not be discernible even if they were dominant. Hence, the application of an adequate experimental design is the optimal strategy to obtain maximum information with a minimum number of experiments. The surface response methodology can provide an empirical model of the disinfection kinetic, based on the diverse variables of interest.

With the aim of determining the intrinsic susceptibility of *Legionella* strains, the disinfection kinetics of monochloramine on *Legionella* bacteria isolated from various treated or non-treated cooling circuits was investigated. Their susceptibilities were compared with those of bacteria taken from collections (*Legionella* and non-*Legionella* strains).

MATERIALS AND METHODS

BACTERIAL STRAINS AND CULTURE CONDITIONS

A set of 39 *L. pneumophila* strains was used to evaluate their susceptibilities to monochloramine (Table 1). These strains originated from water or biofilms and were isolated from a river, upstream or downstream from a nuclear power plant, or directly from various cooling circuits in nuclear power plants located in France. These cooling circuits were either non-treated or treated with monochloramine at a concentration of $0.25 \pm 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$ in continuous or sequential conditions. *L. pneumophila* strains from the continuously treated circuits were isolated over the course of the treatment and beyond. Strains from the sequentially treated circuits were collected between two disinfection stages.

To compare the susceptibility of *L. pneumophila* with that of *L. spp.* strains, 14 *L. spp.* strains from the Pasteur Institute Collection were used (see Table 1). Susceptibilities of bacteria belonging to the genus *Legionella* were also compared with those of other bacteria belonging to non-*Legionella* genera. These non-*Legionella* bacteria belonged to Gram-negative and Gram-positive groups and were used to screen a wide range of susceptibilities.

All the strains were precultured in the laboratory before their use in the inactivation studies. *Legionella* strains were cultured on BCYE media supplemented with L-cysteine, or on GVPC (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific, USA), depending on their growth abilities on media, for four days at $37 \pm 2^\circ\text{C}$. *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* and *Corynebacterium glutamicum* were cultured on R2A, Cetrimide medium and blood agar, respectively (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific, USA), at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for two days. *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus brevis* were cultured on Baird Parker and MRS media (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific, USA) respectively, for two days at $37 \pm 2^\circ\text{C}$. After culture, strains were suspended in sterile phosphate buffer (100

mM, pH 7.5) before disinfection treatment. The concentration was adjusted by A_{595} measurement at 595 nm (one $A_{595\text{nm}}$ unit = 10^9 cells.mL⁻¹).

Legionella strains isolated from the environment were subject to comprehensive identification. Their genera, species and serogroups were identified using culture methods and latex agglutination in accordance with the AFNOR Standard method (3). The *mip* gene was sequenced to confirm the species identification (28) and a molecular typing method, Infrequent-Restriction-Site PCR (IRS-PCR), was used to discriminate between *L. pneumophila* strains (19).

MONOCHLORAMINE DISINFECTION ASSAYS

The monochloramine was prepared by combining a predetermined volume of sodium hypochlorite to ammonia solution with a chlorine to nitrogen mass ratio of 4.8 and a pH of 8.3. Stock solutions of monochloramine at 1g.L⁻¹ were stored at 4°C. Monochloramine concentrations were determined at the beginning and end of each assay using the DPD (N,N'-diethyl-P-phenylenediamine) colorimetric method in accordance with the manufacturer's procedures.

Disinfection assays were performed by inoculating 10^8 to 10^{11} bacteria per liter and 0.7 to 1 ppm monochloramine to 150 mL of sterile phosphate buffer (100 mM, pH 7.5). Samples were incubated at a controlled temperature (25°C – 35°C) and pH (7.5 – 8.5) and were continuously agitated by magnetic stirring. The survival of the bacteria was analysed after 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60 minutes of treatment. A longer treatment was performed (90 to 120 minutes) on less susceptible strains. Samples were then treated with sterile sodium thiosulfate (20 mg.L⁻¹) to quench the monochloramine residual. Ten-fold serial dilutions were plated on the appropriate medium. The detection limit of the culture was 10^4 CFU.L⁻¹. Bacterial concentrations were determined after a five-day culture for non-*Legionella* bacteria and after a ten-day culture for *Legionella* bacteria at the appropriate temperature. Disinfection assays were performed in triplicate for non-*Legionella* bacteria and only once for *Legionella* bacteria as the variation coefficient of the method is known for this genus. High or low Ct_{99.9%} values were confirmed by additional experiments. For each experiment, a disinfectant consumption control without microorganisms and a bacterial survival control without biocide were performed to evaluate the stability of the biocide and the natural survival of the bacteria.

Experimental parameters, including temperature, pH, initial biocide and bacterial concentrations, were determined using a factorial design experiment combined with the RSM.

CT DETERMINATION

Ct values were determined according to the Chick and Watson expression (10, 33), $\log \frac{N}{N_0} = -kC^n t$, where $\frac{N}{N_0}$ is the fraction of viable cells after disinfectant exposure, k is a rate constant for a specific microorganism and set of conditions, C is the disinfectant concentration and n is the coefficient of biocide activity depending on the type of biocide and experimental variables.

Microorganism susceptibility was quantified by Ct (in mg.min.L⁻¹), which corresponds to the geometric area below the disinfectant decay curve. As frequently used in literature, Ct

values were calculated in our study for a 3-log inactivation ($Ct_{99.9\%}$) (2, 13). The time necessary to inactivate 99.9% ($t_{99.9\%}$) of the bacteria was calculated by linear regression of the curve $\log \frac{N}{N_0} = f(t)$. The Ct value was the mathematical product of $t_{99.9\%}$ and the initial concentration of monochloramine.

DEVELOPMENT AND OPTIMISATION OF THE METHOD USING THE MULTIFACTORIAL EXPERIMENTAL DESIGN AND RSM

In order to validate the microorganism susceptibility determination method according to two defined criteria, a multifactorial experimental design, combined with an RSM, was used. The two responses were: (i) to observe a 3-log bacterial reduction in approximately 30 minutes ($Y_1 = t_{99.9\%} = 30$ min) and (ii) to ensure a minimal effect of the experimental variables on the effectiveness of the monochloramine, *i.e.* $Y_2 = n = 1$. Four factors affecting the two responses, which would be easily controllable in the laboratory, were selected: temperature (X_1), pH (X_2), initial monochloramine concentration (X_3) and initial bacterial concentration (X_4). The four process parameters were added at two levels: low (-1) and high (+1). The low and high levels were chosen based on knowledge of the physicochemical characteristics of cooling waters with regard to temperature and pH, and the ability to obtain a rapid and detectable decay for monochloramine and bacterial concentration (Table 2). The central values (zero level) chosen were: $T^\circ = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8.0$, $[\text{NH}_2\text{Cl}] = 0.85$ ppm and $[\text{bacteria}] = 3.10^9$ cells.L⁻¹. To develop the regression equation, the test variables were coded according to the following equation: $X_i = \frac{x_i - \bar{x}_i}{\Delta x_i}$ ($i = 1, 2, 3, 4$) where X_i is the coded value for the independent variable, x_i is the real value of the independent variable, $\bar{x}_i$ is the real value of the independent variable at the centre point and Δx_i is the value of the step change. The response variables were fitted using a first order model in order to correlate response variables to the independent variables. The general form of the equation is:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{124}X_1X_2X_4 + b_{134}X_1X_3X_4 + b_{234}X_2X_3X_4 + b_{1234}X_1X_2X_3X_4$$

where Y refers to the measured response, X_1 , X_2 , X_3 and X_4 to the independent coded variables, b_0 to the offset term, b_1 , b_2 , b_3 and b_4 to the linear effects and b_{ijkl} to the interaction terms. The multifactorial experimental design for four independent variables, each at two levels, consisted of 16 experiments, which permitted the determination of the b terms. Two additional experiments enabled model validation (Table 2). For each experiment, $Y_1 = t_{99.9\%}$ was measured as described in the previous section and $Y_2 = n$ was calculated from the $t_{99.9\%}$ measured by pair tests where only the monochloramine concentration varied as below:

$$n = \frac{\ln(t_{b99.9\%}) - \ln(t_{a99.9\%})}{\ln(C_a) - \ln(C_b)}$$

After modelling the responses, the RSM used a graphical representation to visualise the relationship between the response and the experimental levels of each variable to deduce the optimum conditions. Three-dimensional graphs were generated for the pairwise combination of two factors, while the other two were maintained at the extreme level (-1 or +1). The combination of optimum values reported for each interaction allowed us to determine the optimal experimental values for the method.

To validate the defined protocol, a reproducibility study was performed by independently testing the same strain 11 times. Reproducibility studies enabled us to determine the coefficient of variation (CV) of the method.

All experiments were performed using the reference *L. pneumophila* strain ATCC 33152.

RESULTS

PROTOCOL DEVELOPMENT USING THE MULTIFACTORIAL EXPERIMENTAL DESIGN AND RSM

The multifactorial experimental design was used to determine the optimum conditions, including temperature (X_1), pH (X_2), monochloramine (X_3) and bacterial (X_4) concentrations, to observe a 3-log bacterial reduction in approximately 30 minutes (Y_1) and to optimise the monochloramine activity (Y_2). Sixteen experiments were then performed and responses were experimentally determined (Table 2). Using the multifactorial experimental design and experimental responses, models were constructed to determine the effects of the parameters on responses:

$$Y_1 = 318 - 239X_1 + 253X_2 + 205X_3 + 263X_4 - 282X_1X_2 - 234X_1X_3 - 210X_1X_4 \\ + 240X_2X_3 + 218X_2X_4 + 196X_3X_4 - 201X_1X_2X_3 - 250X_1X_2X_4 \\ - 221X_1X_3X_4 + 228X_2X_3X_4 - 188X_1X_2X_3X_4$$

$$Y_2 = -0.3945 + 1.5229X_1 - 2.0595X_2 - 2.7756 \cdot 10^{-17} X_3 - 0.6979X_4 + 0.3779X_1X_2 \\ + 2.7756 \cdot 10^{-17} X_1X_3 + 0.8645X_1X_4 - 2.7756 \cdot 10^{-17} X_2X_3 - 1.4079X_2X_4 \\ + 2.7756 \cdot 10^{-17} X_3X_4 + 2.7756 \cdot 10^{-17} X_1X_2X_3 - 0.4254X_1X_2X_4 \\ - 2.7756 \cdot 10^{-17} X_1X_3X_4 + 2.7756 \cdot 10^{-17} X_2X_3X_4 - 2.7756 \cdot 10^{-17} X_1X_2X_3X_4$$

To ensure their predictions, these models were tested under various experimental conditions, as shown in Table 2 (runs 17 and 18). Responses Y_1 and Y_2 were defined according to developed models (predicted responses) and experimental results (measured responses). For experimental conditions 17 and 18, predicted responses Y_1 were respectively 25.71 and 58.21 minutes, while measured responses Y_1 were respectively 35.63 and 49.92 minutes. For the pair of conditions 17 and 18, the predicted response Y_2 was 1.43 whereas the measured response was 1.51. The residuals between predictive and real response values were low (less than 10 minutes for Y_1 and less than 0.1 for Y_2), meaning that the models could be validated.

The models developed in our study showed that all four variables, and their interactions, affect the contact time required to inactivate 99.9% of the bacteria (Fig. 1a), whereas only the temperature, pH and bacterial concentration, and their interactions, affect monochloramine efficiency (Fig. 1b). All experimental parameters had an impact on the $t_{99.9\%}$ with the same order of magnitude but, interestingly, the greatest effect on the response was not associated with any of the parameters tested, meaning that unmeasured experimental factors have a significant impact on the $t_{99.9\%}$. The temperature has a systematic negative effect on the response, whereas others parameters positively influence the $t_{99.9\%}$. Although almost all are equivalent, among the measured parameters the combination of pH and temperature has the greatest influence on the time required to inactivate 3-log units of bacterial concentration. The efficiency of monochloramine is mostly influenced by pH and temperature, but in a converse way, as pH affects monochloramine activity negatively and temperature affects it positively.

The RSM was applied to define the optimal conditions for monochloramine inactivation of bacteria. Optimum levels of temperature, pH, monochloramine and bacterial concentrations were determined by plotting response surface curves against any two independent parameters, while keeping the other two at the extreme level (“-1” and “+1”). Thus, for each response, eight response surfaces were obtained by considering all possible combinations. The 3D response surface curves and their respective contour plots provided information about the interaction between two parameters and allowed a rapid prediction and interpretation of the optimum experimental conditions (Fig. 2). All of the curves are available as supplementary material. The RSM was used to determine the optimal intervals for each variable corresponding to the defined criteria for method validation, *i.e.* $Y_1 = t_{99.9\%} = 30$ min, and $Y_2 = n = 1$. The experimental parameter level needed to be within the smallest common interval determined for each response. The X_1 level (temperature) needed to be between [-0.6; -0.2] or [0.8; +1], equivalent to [27; 29°C] or [34; 35°C]. The pH level (X_2) would be between 7.5 and 7.55. The initial concentration of monochloramine (X_3) needed to be between 0.82 and 1.00 mg.L⁻¹. The initial bacterial concentration (X_4) would be between 2.10^8 and 8.10^8 CFU.L⁻¹. Our experimental conditions were then arbitrarily chosen from within the optimal intervals: $T^\circ = 28^\circ\text{C}$, pH = 7.5, $[\text{NH}_2\text{Cl}]_0 = 0.9$ mg.L⁻¹ and $N_0 = 5.10^8$ CFU.L⁻¹. The predicted and measured responses with these values were in agreement (data not shown).

To validate the defined protocol, a reproducibility study was performed by 11 independent tests on the same strain. Method reproducibility was high, as the coefficient of variation determining the method error was 19%. The reference strain, *L. pneumophila* strain ATCC 33152, presented a $\text{Ct}_{99.9\%} = 22.65 \pm 4.28$ mg.min.L⁻¹.

SUSCEPTIBILITIES OF SELECTED BACTERIA TO MONOCHLORAMINE BIOCIDES

The aim of this study was to determine the susceptibilities of *Legionella* strains isolated from nuclear power plant cooling circuits in different disinfection conditions, and to compare these susceptibilities with those of reference strains, whether or not they belonged to the genus *Legionella*. The $\text{Ct}_{99.9\%}$ was measured, using the protocol defined by the multifactorial experimental design and the RSM, on non-*Legionella* bacteria and on *L. pneumophila* strains from the Pasteur Institute Collection.

Among the non-*Legionella* bacteria, *E. coli* was the most sensitive strain with a $\text{Ct}_{99.9\%}$ value of 10.3 ± 1.67 mg.min.L⁻¹ followed by *C. glutamicum* ($\text{Ct}_{99.9\%} = 16.84 \pm 1.18$ mg.min.L⁻¹), *P. fluorescens* ($\text{Ct}_{99.9\%} = 22.19 \pm 3.04$ mg.min.L⁻¹), *L. brevis* ($\text{Ct}_{99.9\%} = 48.67 \pm 1.43$ mg.min.L⁻¹) and *S. aureus*, which presented the lowest sensitivity with a $\text{Ct}_{99.9\%}$ value of 54.06 ± 9.21 mg.min.L⁻¹ (Fig. 3a).

The two *L. pneumophila* reference strains, ATCC 33823 and ATCC 33152, showed the same inactivation kinetics and presented an equivalent sensitivity against monochloramine (Figure 3b). With $\text{Ct}_{99.9\%}$ values of 22.24 ± 4.22 mg.min.L⁻¹ for the strain ATCC 33152 and 24.08 ± 4.57 mg.min.L⁻¹ for the strain ATCC 33823, the *L. pneumophila* species presented a moderate sensitivity compared to the *L. spp.* strains and other non-*Legionella* bacteria (Fig. 4). Interestingly, the sensitivity of strains belonging to the genus *Legionella* extended to the widest range. Indeed, *L. tusconensis* was the most susceptible species ($\text{Ct}_{99.9\%} = 9.17 \pm 1.74$ mg.min.L⁻¹) and was about seven times more susceptible than *L. cincinnatiensis* ($\text{Ct}_{99.9\%} = 68.15 \pm 0.67$ mg.min.L⁻¹).

L. pneumophila strains isolated from nuclear power plant cooling circuits were identified using French guidelines (3). Their genera and species were confirmed by *mip* gene sequencing (28) and the IRS-PCR molecular typing method was used to identify them (19).

The $Ct_{99.9\%}$ values of the environmental *L. pneumophila* strains ranged between 16.14 ± 3.07 mg.min.L⁻¹ and 64.88 ± 19.07 mg.min.L⁻¹ (Fig. 5). The susceptibilities of the environmental strains matched the susceptibilities of the non-*Legionella* bacteria, situated between the susceptibilities of *L. tusconensis* and *L. cincinnatiensis*. As shown in Figure 5, a ranking of strains based on their $Ct_{99.9\%}$ values did not reveal a number of characteristics that would be able to explain their susceptibilities. Indeed, it appeared that the susceptibilities of the environmental *L. pneumophila* strains were not linked to either their geographical origin (geographical location of the plant and their location upstream, inside or downstream from the plant) or to their initial matrix (water or biofilm) or serogroup identification (1 or 2 to 14). Moreover, the treatment phase (with, without or between two monochloramine treatment phases) did not have any impact on *Legionella* susceptibility, meaning that the use of monochloramine in the cooling circuit would not select monochloramine tolerant strains.

Interestingly, $Ct_{99.9\%}$ values followed a normal distribution except for the three most tolerant strains. These three strains presented high $Ct_{99.9\%}$ values (61.74 ± 11.73 ; 62.09 ± 10.72 and 64.88 ± 19.07 mg.min.L⁻¹) and were statistically more tolerant than the other environmental *L. pneumophila* strains (Grubbs test, $\alpha=0.05$). Their susceptibilities were higher than those of the non-*Legionella* bacteria, *S. aureus* (54.06 ± 9.21 mg.min.L⁻¹) and *L. brevis* (48.67 ± 1.43 mg.min.L⁻¹), but lower than that of *L. cincinnatiensis* (68.15 ± 0.67 mg.min.L⁻¹). Interestingly, these three strains belonged to the IRS-PCR type G2 and were isolated from various matrices and power plants that were not treated with monochloramine biocide. These three strains were subject to SBT typing (28) and were not identical according to their sequence types (data not shown). Other strains belonging to the IRS-PCR type G2 were tested but they presented moderate $Ct_{99.9\%}$ values, between 26.31 ± 1.18 and 31.46 ± 7.08 mg.min.L⁻¹; indicating that tolerance to monochloramine is not a characteristic of the entire G2 type. Moreover, no other links between *L. pneumophila* identification (serogroups and IRS-PCR types) and their monochloramine susceptibilities were observed during this study.

DISCUSSION

This study was performed to define the intrinsic susceptibility of *L. pneumophila* strains isolated from cooling circuits during different disinfection processes, and to determine whether biocide usage in artificial systems could select biocide-tolerant *Legionella*. To define bacterial monochloramine susceptibility, an *in vitro* method to determine $Ct_{99.9\%}$ values was developed. $Ct_{99.9\%}$ values are defined as the mathematical product of the biocide concentration (mg.L⁻¹) and time (minutes) required to inactivate 3-log units of bacterial concentration. The Ct parameter reflects the natural susceptibility of bacteria to the biocide (10, 33), although it is highly sensitive to experimental conditions (29). To develop a robust and reproducible method, optimum laboratory conditions, in terms of the temperature, pH, [NH₂Cl] and bacterial concentrations, were established based on a multifactorial experimental design combined with response surface methodology. The parameters were optimised to meet two method validation criteria: (i) to observe a 3-log unit decay of *Legionella* in approximately 30 minutes and (ii) to retain significant monochloramine activity.

This original approach appears to be ideal for obtaining a maximum of information with a minimum number of experiments. The temperature, pH and initial bacterial concentration appeared to have a significant effect on *Legionella* susceptibility to monochloramine. The temperature and pH, when combined, had a greater effect on the inactivation speed than when observed individually. In both cases, the effects of these two parameters were the reverse. Increasing the temperature had a negative effect on the 99.9% inactivation time and a positive effect on monochloramine activity, whereas increasing the pH presented a positive effect on the 99.9% inactivation time and a negative effect on monochloramine activity. Although experimental condition effects are generally measured based on Ct values, these results were in agreement with those observed in past studies. Thus, studies on *Cryptosporidium parvum* inactivated with monochloramine, at a constant concentration, have shown that pH has a positive effect on Ct values, whereas temperature presents a negative effect (12, 29). Modelling of the experimental outcomes showed that the 99.9% inactivation time was dependent on other unmeasured parameters. The effect of these unknown factors seemed to be significant and should be studied more thoroughly in order to identify factors that could modulate monochloramine efficiency in laboratory conditions.

The protocol defined by the multifactorial experimental design and RSM was used to determine the intrinsic susceptibility of *L. pneumophila* strains isolated from various nuclear power plant cooling circuits during different treatment processes. The Ct_{99.9%} values of these strains were compared with those of non-*Legionella* and *Legionella* species from the Pasteur Institute Collection. For non-*Legionella* bacteria, monochloramine susceptibility was ordered as follows (from the most to the least susceptible strain): *E. coli* < *C. glutamicum* < *P. fluorescens* < *L. brevis* < *S. aureus*. Thus, except for *C. glutamicum*, it appeared that monochloramine susceptibility was linked to Gram stain characteristics. Gram-negative bacteria presented lower Ct_{99.9%} values than Gram-positive bacteria. This is consistent with previous studies, which have shown that Gram-negative bacteria are generally more susceptible than Gram-positive bacteria. This is a result of the better penetration of monochloramine, a lipophilic biocide, in Gram-negative bacteria, whose cell membranes comprise two lipid bilayers, unlike Gram-positive bacteria, which have only one surrounded by a peptidoglycan wall (2, 32). *C. glutamicum*, a Gram-positive bacterium, exhibited a Ct_{99.9%} value between those for the Gram-negative bacteria. This bacterium belongs to the suborder *Corynebacterineae* in which the *Mycobacterium* and *Norcardia* genera are also present. These three genera are known to produce a complex cell envelope, containing various lipid species, as well as mycolic acid residues covalently linked to arabinogalactan which, in turn, is linked to peptidoglycan (4). Their outer membrane consists of a bilayer structure which acts as an effective permeability barrier, like the outer membrane of Gram-negative bacteria (20). The lipid structure of the cell membrane of these microorganisms could explain the observed high susceptibility of *C. glutamicum*. The high susceptibility of the *Corynebacterineae* suborder was confirmed by a disinfection assay on *Mycobacterium vaccae* ATCC 15483 (data not shown). As observed for *C. glutamicum*, after one hour of monochloramine treatment at 0.9 ppm, *M. vaccae* was no longer detectable by culture methods, demonstrating its high sensitivity to this biocide. These results may be surprising in view of previous literature, as studies on the effectiveness of monochloramine against *M. avium* have revealed their high resistance to this biocide (6, 23, 30). However, *Mycobacterium* species other than *M. avium*, such as *M. terrea*, appear to be very sensitive to monochloramine, suggesting a strong inter-species variability in terms of the monochloramine susceptibility of this genus (25).

This inter-species variability of monochloramine susceptibility was also observed among *Legionella* species. Indeed, among selected strains from the Pasteur Institute Collection, *L. tusconensis* was the most susceptible strain whereas *L. cincinnatiensis* was the least susceptible. While all species of *Legionella* exhibited $Ct_{99.9\%}$ values within the same range as other Gram-negative bacteria, surprisingly, *L. cincinnatiensis* presented a $Ct_{99.9\%}$ value higher than that of the Gram-positive *S. aureus* strain.

L. pneumophila strains isolated from the environment also showed a high degree of variability in terms of their monochloramine susceptibilities. These strains were less susceptible than Gram-positive bacteria, except for three strains which were more susceptible than Gram-positive bacteria but less than *L. cincinnatiensis*. These three strains belonged to the IRS-PCR type G2 but were not identical according to their SBT profiles. Although other strains with moderate monochloramine susceptibility were also identified as G2 types, this result suggests that their monochloramine tolerance has a genetic origin, resulting in the higher tolerance of a G2 IRS-PCR subgroup. This could result in differences in the cellular composition between susceptible and tolerant bacteria, or in different cell responses to exposure to the biocide. To investigate these hypotheses, firstly it would be useful to better characterise the mode of action of monochloramine on bacterial cells, and to determine which sites in the cell are the most affected by the biocide. Cellular differences between bacteria could then possibly explain the variability in their susceptibilities. Secondly, a study investigating the cellular response of bacterial cells to the presence of monochloramine would allow a better understanding of the mechanisms involved in bacterial tolerance. Such a study could be performed by analysing and comparing the transcriptomic responses of susceptible and tolerant strains. Berry *et al.* (5) have defined, by performing a comparative transcriptomic analysis of the response of *E. coli* to monochloramine, a core set of genes responsible for increased tolerance to stresses, known as the “stressome”. Identifying and comparing gene expression involved in bacterial tolerance between susceptible and non-susceptible strains would aid our understanding of susceptibility variations within the same bacterial species, as in the case of *L. pneumophila* species isolated from cooling circuits.

Although environmental *L. pneumophila* biocide susceptibility was found to cover a wide range of $Ct_{99.9\%}$ values, the results from this study suggest that monochloramine usage in nuclear power plant cooling circuits does not select more tolerant strains. Indeed, their susceptibilities were not ranked according to the treatment conditions during their isolation. These results are in agreement with those of Garcia *et al.* (16), who performed a long-term environmental monitoring study of *Legionella* persistence in chlorinated systems. The authors showed, by measuring the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC), that biocide usage in water systems does not increase the susceptibility of persistent *Legionella* strains. They concluded that biocide usage does not result in the selection of more tolerant strains in water systems.

Moreover, despite the higher tolerance of some strains, considering the concentration of monochloramine used during the cooling circuit disinfection process ($0.25 \pm 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$), in these conditions, the theoretical time required to inactivate 99.9% of *Legionella* is approximately four hours. Given that the minimum residence time of bacteria in cooling circuits is approximately six hours, this shows that the disinfection process used to eradicate *Legionella* bacteria in nuclear power plant cooling circuits is efficient.

Thus, the detection of *Legionella* bacteria during monochloramine treatment, and the rapid re-colonisation of nuclear power plant cooling circuits after a disinfection process, cannot be explained by the selection of strains that are naturally more biocide-tolerant. Possible explanations can be suggested to understand these phenomena. These include the protection of *Legionella* bacteria by higher organisms, such as amoebae (1, 31). However, a recent study has shown that monochloramine is effective on free *Legionella* as well as on intra-amoebic *Legionella* bacteria (13). Another possible explanation is protection based on biofilm location. Biofilms are known to reduce biocide efficiency by acting as a physical barrier to biocide penetration (11, 15, 21). The salting-out of the biofilm bacteria in the water phase could explain the detection of *Legionella* during treatment and the rapid re-colonisation of cooling circuits. Moreover, post-amoebic and sessile *Legionella* exhibit a different phenotype than planktonic ones, enhancing their tolerance to biocide through the synthesis of proteins involved in oxidative stress (9, 17).

In conclusion, this study has shown that monochloramine usage in nuclear power plant cooling circuits does not induce a selection pressure leading to the persistence of tolerant *Legionella* bacteria. Although *Legionella* are, sometimes, still detectable at low concentrations during the treatment process, and although the cooling circuits are often rapidly re-colonised after treatment has ceased, disinfecting these water systems with monochloramine is effective and is not related to re-colonisation. The origin of these phenomena remains unclear and they may be caused by environmental factors such as biofilm location and protozoa protection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Electricité de France (EDF) and from the National Association for Research and Technology (ANRT), which are linked together by an industrial research doctoral training contract (CIFRE).

Emilie LEHERICEY (EDF R&D) and Gaëlle LE-MEUR (AJILON ENGINEERING) are particularly acknowledged for their contribution to the sampling campaigns and to parts of the laboratory tests.

REFERENCES

1. Alleron, L., N. Merlet, C. Lacombe and J. Frère. 2008. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol.* 57:497-502.
2. Arnitz, R., M. Nagl and W. Gottardi. 2009. Microbicidal activity of monochloramine and chloramine T compared. *J Hosp Infect.* 73:164-170.
3. Association française de Normalisation "Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila*: Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. NF T90-431." Book *Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de Legionella spp et de Legionella pneumophila: Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. NF T90-431.* Editor ed.^eds. ed., 2006, p.

4. Bansal-Mutalik, R. and H. Nikaido. 2011. Quantitative lipid composition of cell envelopes of *Corynebacterium glutamicum* elucidated through reverse micelle extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:15360-15365.
5. Berry, D., D. Holder, C. Xi and L. Raskin. 2010. Comparative transcriptomics of the response of *Escherichia coli* to the disinfectant monochloramine and to growth conditions inducing monochloramine resistance. *Water Res*. 44:4924-4931.
6. Berry, D., M. Horn, C. Xi and L. Raskin. 2010. *Mycobacterium avium* infections of *Acanthamoeba* strains: host strain variability, grazing-acquired infections, and altered dynamics of inactivation with monochloramine. *Appl Environ Microbiol*. 76:6685-6688.
7. Berry, D., C. Xi and L. Raskin. 2006. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr Opin Biotechnol*. 17:297-302.
8. Campese, C., S. Jarraud, C. Maine and D. Che. 2011. Legionnaires' disease in France: increase of the number of cases in 2010. *BEH*. 29-30:325-327.
9. Chang, C.W., Hwang YH, Cheng WY, Chang CP. 2007. Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J Appl Microbiol*. 102:1636-1644.
10. Chick, H. 1908. An investigation of the laws of disinfection. *J Hyg*. 8:92.
11. Cooper, I.R. and G.W. Hanlon. 2010. Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect*. 74:152-159.
12. Driedger, A., E. Staub, U. Pinkernell, B. Mariñas, W. Köster and U.v. Gunten. 2001. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores and formation of bromate during ozonation. *Water Res*. 35:2950-2960.
13. Dupuy, M., S. Mazoua, F. Berne, *et al.* 2011. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res*. 45:1087-1094.
14. Flannery, B., L.B. Gelling, D.J. Vugia, *et al.* 2006. Reducing *Legionella* colonization of water systems with monochloramine. *Emerg Infect Dis*. 12:588-596.
15. Gagnon, G.A., J.L. Rand, K.C. O' Leary, A.C. Rygel, C. Chauret and R.C. Andrews. 2005. Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water Res*. 39:1809-1817.
16. Garcia, M.T., B. Baladron, V. Gil, M.L. Tarancon, A. Vilasau, A. Ibanez, C. Elola and C. Pelaz. 2008. Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *J Appl Microbiol*. 105:837-847.
17. Hindre, T., H. Bruggemann, C. Buchrieser and Y. Hechard. 2008. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology*. 154:30-41.
18. Jacangelo, J.G., Olivieri, V. P. & Kawata, K. 1991. Investigating the mechanism of inactivation of *Escherichia coli* B by monochloramine. *Journal AWWA*. 83:80-87.
19. Jakubek, D., M. Le Brun, G. Leblon, M. DuBow and M. Binet. 8 November 2012. Validation of IRS PCR, a molecular typing method, for the study of the diversity and population dynamics of *Legionella* in industrial cooling circuits. *Lett Appl Microbiol*. doi:10.1111/lam.12025.

20. Jarlier, V. and H. Nikaido. 1990. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. J Bacteriol., 172:1418-1423.
21. Langmark, J., M.V. Storey, N.J. Ashbolt and T.-A. Stenstrom. 2005. Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. Appl Environ Microbiol. 71:706-712.
22. Lin, Y.-s.E., V.L. Yu, R.D. Vidic and S.J. States. 2000. Discussion of monochloramine and Legionnaires' disease'. Journal AWWA. 92:88-90.
23. Luh, J., N. Tong, L. Raskin and B.J. Marinas. 2008. Inactivation of *Mycobacterium avium* with monochloramine. Environ Sci Technol. 42:8051-8056.
24. Malato, S., P. Fernández-Ibáñez, M.I. Maldonado, J. Blanco and W. Gernjak. 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. Catalysis Today. 147:1-59.
25. Nagl, M. and W. Gottardi. 1998. Rapid killing of *Mycobacterium terrae* by N-chlorotaurine in the presence of ammonium is caused by the reaction product monochloramine. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 50:1317-1320.
26. Pryor, M., S. Springthorpe, S. Riffard, T. Brooks, Y. Huo, G. Davis and S.A. Sattar. 2004. Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. Water Sci Technol. 50:83-90.
27. Ramseier, M.K., U. von Gunten, P. Freihofer and F. Hammes. 2011. Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate. Water Res. 45:1490-1500.
28. Ratcliff, R.M., J.A. Lanser, P.A. Manning and M.W. Heuzenroeder. 1998. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. J Clin Microbiol. 36:1560-1567.
29. Rennecker, J.L., J.-H. Kim, B. Corona-Vasquez and B.J. Mariñas. 2001. Role of disinfectant concentration and pH in the inactivation kinetics of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and monochloramine. Environ Sci Technol. 35:2752-2757.
30. Taylor, R.H., J.O. Falkinham, C.D. Norton and M.W. LeChevallier. 2000. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. Appl Environ Microbiol. 66:1702-1705.
31. Thomas, V., T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. Loret and Y. Lévi. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. J Appl Microbiol. 97:950-963.
32. Tumah, H.N. 2009. Bacterial biocide resistance. J Chemother. 21:5-15.
33. Watson, H.E. 1908. A note of the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. J Hyg. 8:536.

FIGURE LEGENDS

- FIGURE 1: Bar graphs showing the standardised estimated effects of the variables tested on the time needed to inactivate 3-log units of bacteria (Figure 1a) and the activity of monochloramine represented by the n factor (Figure 1b) during disinfection assays with monochloramine. The variables tested were temperature, pH, initial monochloramine and bacterial concentrations. Standardised estimated effects correspond to the proportion of each estimated effect (absolute value) relative to the sum of all estimated effects.
- FIGURE 2: A sample of the effects of experimental factors on responses: response surface plot (left) and its contour plots (right) of interactions between variables (temperature and pH at the top; initial monochloramine and bacteria concentrations below) on the time necessary to inactivate 3-log units of bacteria, $Y_1 = t_{99.9\%}$ (Figure 2a) and on the activity of monochloramine, $Y_2 = n$ (Figure 2b).
- FIGURE 3: Reduction of non-*Legionella* bacteria (Figure 3a) and *Legionella pneumophila* ATCC 33152 and ATCC 33823 (Figure 3b) cultivability after monochloramine treatments. Bars represent standard errors of the means of the three independent experiments.
- FIGURE 4: $Ct_{99.9\%}$ values from the monochloramine treatment of non-*Legionella* and *Legionella* strains from the Pasteur Institute Collection. Bars represent standard errors of the method (19%) except for non-*Legionella* bacteria and *L. hackeliae* and *L. cincinnatiensis* for which bars represent standard errors of the mean of three independent experiments.
- FIGURE 5: $Ct_{99.9\%}$ values from the monochloramine treatment of environmental *Legionella pneumophila* strains isolated during various treatment conditions (- without treatment, + during treatment, +/- between two treatment phases). Strains were collected from water or biofilm; upstream, inside or downstream from the cooling circuits. Tags represent their IRS-PCR profiles.

SUPPORTING INFORMATION

- FIGURE S1: Response surface plots (left) and contour plots (right) of interactions between two variables (temperature and pH or initial monochloramine and bacterial concentrations), while the other two variables are maintained at extreme levels, on the time necessary to inactivate 3-log units of bacteria, $Y_1 = t_{99.9\%}$ and on the activity of monochloramine, $Y_2 = n$.

TABLE 1

Strains selected (non-*Legionella* bacteria, *Legionella* species from the Pasteur Institute Collection and environmental *L. pneumophila* strains) for the determination of their susceptibility to monochloramine.

Strain		Serogroup	IRS PCR	Year of sampling	Localization of sampling	Original matrix	NH ₂ Cl
Non- <i>Legionella</i> bacteria							
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536						
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538						
<i>Lactobacillus brevis</i>	CIP 103474						
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032						
<i>Pseudomonas fluorescens</i>							
<i>Legionella</i> bacteria							
Reference strains							
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152	7	L1				
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33823	1	R1				
<i>Legionella feeleeii</i>	ATCC 35849		BJ1				
<i>Legionella longbeachae</i>	ATCC 33484	2	V1				
<i>Legionella jordanis</i>	ATCC 33623		AM1				
<i>Legionella birminghamensis</i>	ATCC 43702		AN1				
<i>Legionella hackeliae</i>	ATCC 35250		AC1				
<i>Legionella londiniensis</i>	ATCC 49505		AG1				
<i>Legionella erythra</i>	ATCC 35303		AR1				
<i>Legionella cincinnatiensis</i>	ATCC 43753		AP1				
<i>Legionella israelensis</i>	ATCC 43119		AO1				
<i>Legionella tusconensis</i>	ATCC 49180		AD1				
<i>Legionella maceachernii</i>	ATCC 35300		AE1				
<i>Legionella bozemanai</i>	ATCC 35545	2	N1				
Environmental <i>Legionella pneumophila</i> strains							
QEE 400	<i>Lp</i>	1	Q2	2005	Cooling circuit	Water	-
QEE 403	<i>Lp</i>	1	Q3	2005	Cooling circuit	Water	-
QEE 527	<i>Lp</i>	1	AB10	2005	Cooling circuit	Water	-
QEE 529	<i>Lp</i>	1	A4	2005	Cooling circuit	Water	-
QEE 531	<i>Lp</i>	2 to 14	A4	2005	Cooling circuit	Water	-
QEE 532	<i>Lp</i>	2 to 14	AB10	2005	Cooling circuit	Water	-
QEE 533	<i>Lp</i>	2 to 14	Q2	2005	Cooling circuit	Water	-
QEE 534	<i>Lp</i>	2 to 14	Q3	2005	Cooling circuit	Water	-
QEE 766	<i>Lp</i>	1	Y2	2008	Cooling circuit	Water	-
QEE 773	<i>Lp</i>	1	Y2	2008	Cooling circuit	Biofilm	-
QEE 1825	<i>Lp</i>	2 to 14	G2	2009	Cooling circuit	Biofilm	-
QEE 1837	<i>Lp</i>	2 to 14	G2	2009	Cooling circuit	Biofilm	-
QEE 1885	<i>Lp</i>	1	A3	2009	Cooling circuit	Water	-
QEE 2343	<i>Lp</i>	1	AB8	2009	Cooling circuit	Water	+
QEE 4195	<i>Lp</i>	2 to 14	G2	2009	Cooling circuit	Water	-
QEE 4595	<i>Lp</i>	2 to 14	J2	2005	Cooling circuit	Water	+/-
QEE 4596	<i>Lp</i>	1	AW6	2005	Cooling circuit	Water	+/-
QEE 5008	<i>Lp</i>	1	AB8	2006	Cooling circuit	Water	+
QEE 5354	<i>Lp</i>	2 to 14	J5	2007	Cooling circuit	Water	-
QEE 5869	<i>Lp</i>	2 to 14	G2	2010	Cooling circuit	Water	-
QEE 5874	<i>Lp</i>	1	G2	2010	Cooling circuit	Water	-
QEE 6048	<i>Lp</i>	1	AW5	2010	Cooling circuit	Water	+
QEE 6054	<i>Lp</i>	2 to 14	AW5	2010	Cooling circuit	Water	+
QEE 6750	<i>Lp</i>	1	G2	2010	Cooling circuit	Water	-
QEE 6905	<i>Lp</i>	2 to 14	AB13	2010	Cooling circuit	Water	-
QEE 6918	<i>Lp</i>	1	AB13	2010	Cooling circuit	Water	-
QEE 7591	<i>Lp</i>	2 to 14	U1	2010	Cooling circuit	Water	+/-
QEE 7592	<i>Lp</i>	2 to 14	AK1	2010	Cooling circuit	Water	+/-
QEE 7604	<i>Lp</i>	2 to 14	U1	2010	Cooling circuit	Water	+/-
QEE 7605	<i>Lp</i>	1	U1	2010	Cooling circuit	Water	+/-
QEE 7614	<i>Lp</i>	2 to 14	AW15	2010	Cooling circuit	Water	+/-
QEE 7615	<i>Lp</i>	2 to 14	AB8	2010	Cooling circuit	Water	+/-
QEE 7748	<i>Lp</i>	2 to 14	S1	2010	Upstream	Water	-
QEE 7830	<i>Lp</i>	2 to 14	AW6	2010	Downstream	Water	+
QEE 7831	<i>Lp</i>	2 to 14	AW6	2010	Cooling circuit	Water	+
QEE 7841	<i>Lp</i>	2 to 14	Q7	2010	Upstream	Water	-
QEE 7842	<i>Lp</i>	2 to 14	Q7	2010	Downstream	Water	+
QEE 10246	<i>Lp</i>	1	G2	2011	Cooling circuit	Water	-
QEE 10420	<i>Lp</i>	2 to 14	G2	2011	Cooling circuit	Water	-

- Strain isolated from a non treated cooling circuit

+ Strain isolated from a cooling circuit treated continuously with monochloramine

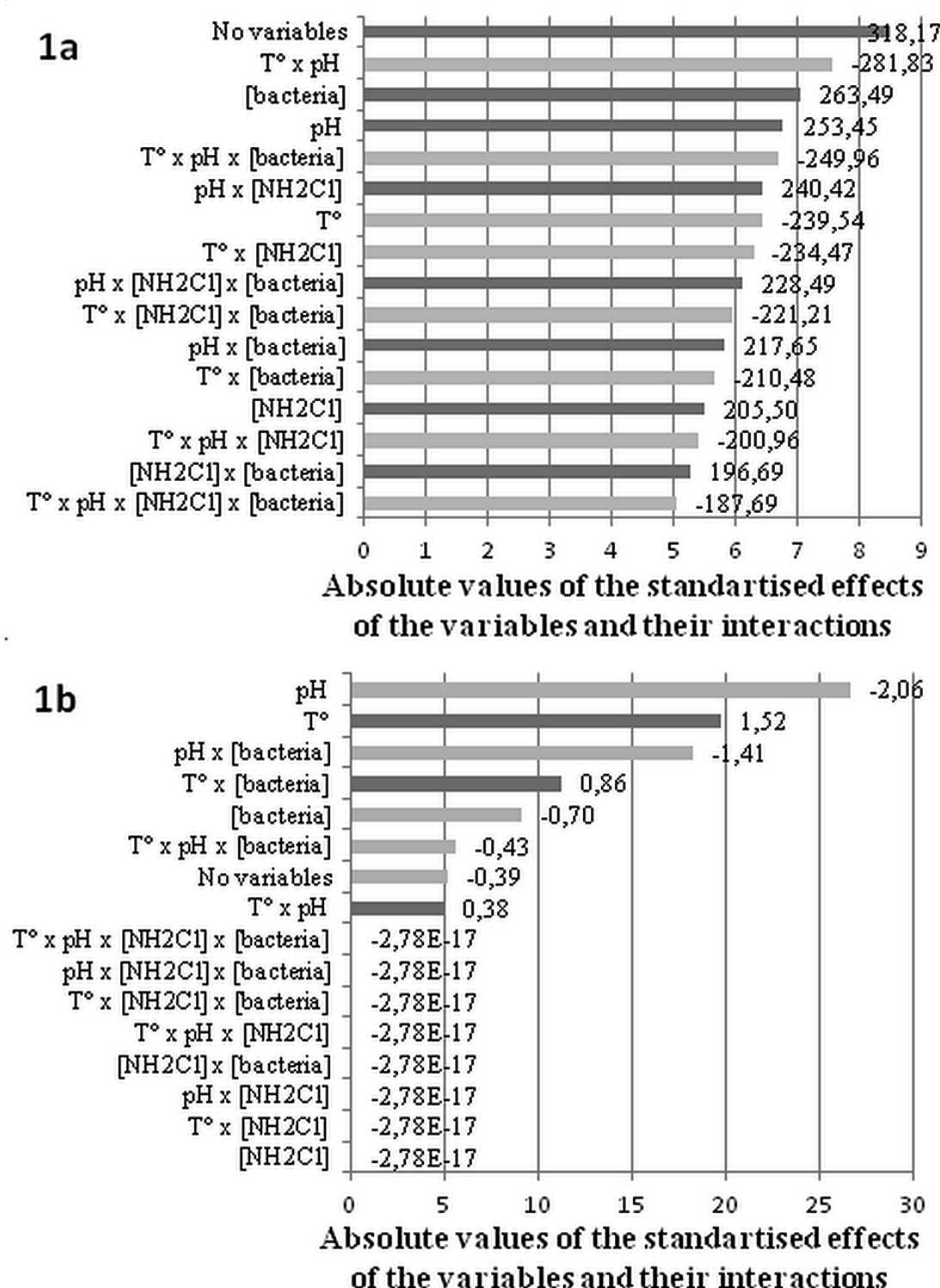
+/- Strain isolated from a cooling circuit treated sequentially with monochloramine and between two treatment phases

TABLE 2

Multifactorial experimental design matrix and measured responses for optimisation of experimental conditions (temperature, pH, [NH₂Cl], [bacteria]).

Run order	Experimental conditions								Measured responses	
	X ₁		X ₂		X ₃		X ₄		Y ₁	Y ₂
	Temperature °C		pH		[NH ₂ Cl] mg.min.L ⁻¹		[bacteria]t ₀ cells/mL		t _{99.9%} min	n
1	+ 1	35	+ 1	8.5	+ 1	1	+ 1	10 ¹¹	97.71	-2.22
2	+ 1	35	+ 1	8.5	+ 1	1	-1	10 ⁸	23.75	1.1134
3	+ 1	35	+ 1	8.5	-1	0.7	+ 1	10 ¹¹	44.18	-2.22
4	+ 1	35	+ 1	8.5	-1	0.7	-1	10 ⁸	35.33	1.1134
5	+ 1	35	-1	7.5	+ 1	1	+ 1	10 ¹¹	58.6	4.81
6	+ 1	35	-1	7.5	+ 1	1	-1	10 ⁸	18.6	0.81
7	+ 1	35	-1	7.5	-1	0.7	+ 1	10 ¹¹	326.1	4.81
8	+ 1	35	-1	7.5	-1	0.7	-1	10 ⁸	24.8	0.81
9	-1	25	+ 1	8.5	+ 1	1	+ 1	10 ¹¹	3750	-6.9
10	-1	25	+ 1	8.5	+ 1	1	-1	10 ⁸	198.67	-1.81
11	-1	25	+ 1	8.5	-1	0.7	+ 1	10 ¹¹	319.15	-6.9
12	-1	25	+ 1	8.5	-1	0.7	-1	10 ⁸	104.16	-1.81
13	-1	25	-1	7.5	+ 1	1	+ 1	10 ¹¹	29.12	-0.06
14	-1	25	-1	7.5	+ 1	1	-1	10 ⁸	12.94	1.1
15	-1	25	-1	7.5	-1	0.7	+ 1	10 ¹¹	28.5	-0.06
16	-1	25	-1	7.5	-1	0.7	-1	10 ⁸	19.2	1.1
17	0	30	-1	7.5	+1	1	-0.33	10 ⁹	35.63	1.51
18	0	30	-1	7.5	-0.33	0.8	-0.33	10 ⁹	49.92	1.51

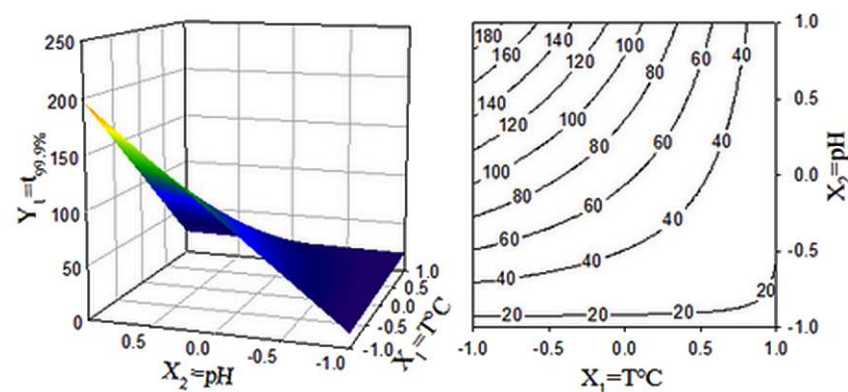
FIGURE 1



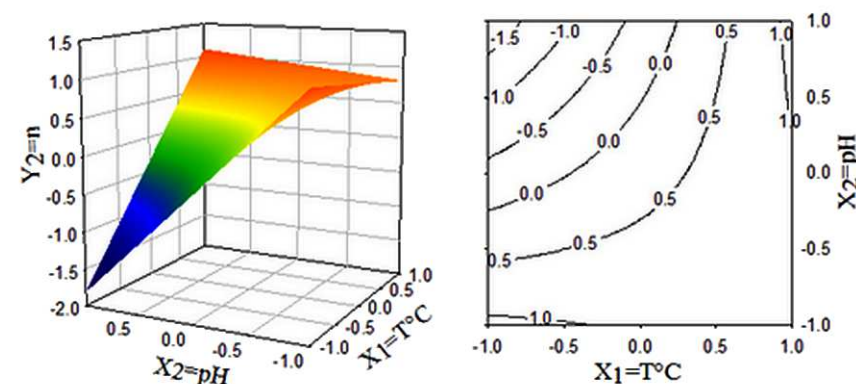
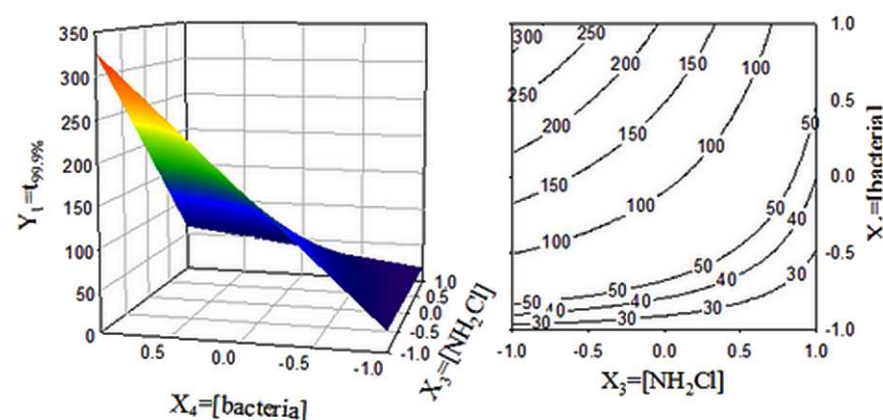
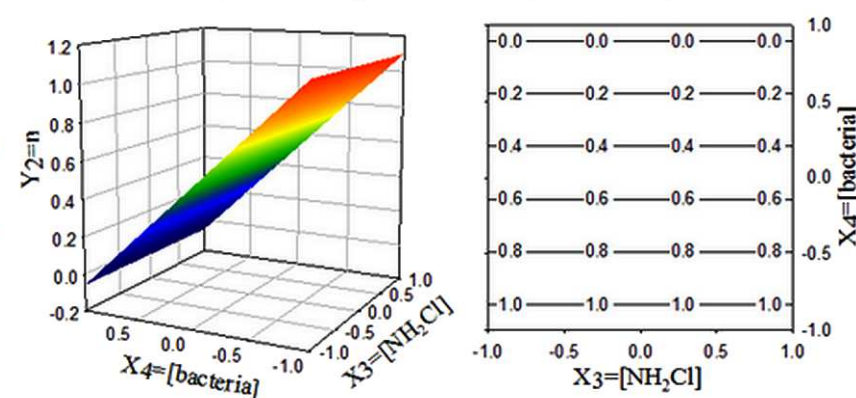
Bar graphs showing the standardised estimated effects of the variables tested on the time needed to inactivate 3-log units of bacteria (Figure 1a) and the activity of monochloramine represented by the n factor (Figure 1b) during disinfection assays with monochloramine. The variables tested were temperature, pH, initial monochloramine and bacterial concentrations. Standardised estimated effects correspond to the proportion of each estimated effect (absolute value) relative to the sum of all estimated effects.

FIGURE 2

2a

 Y_1 against X_1 and X_2 for $X_3=+1$ and $X_4=-1$ 

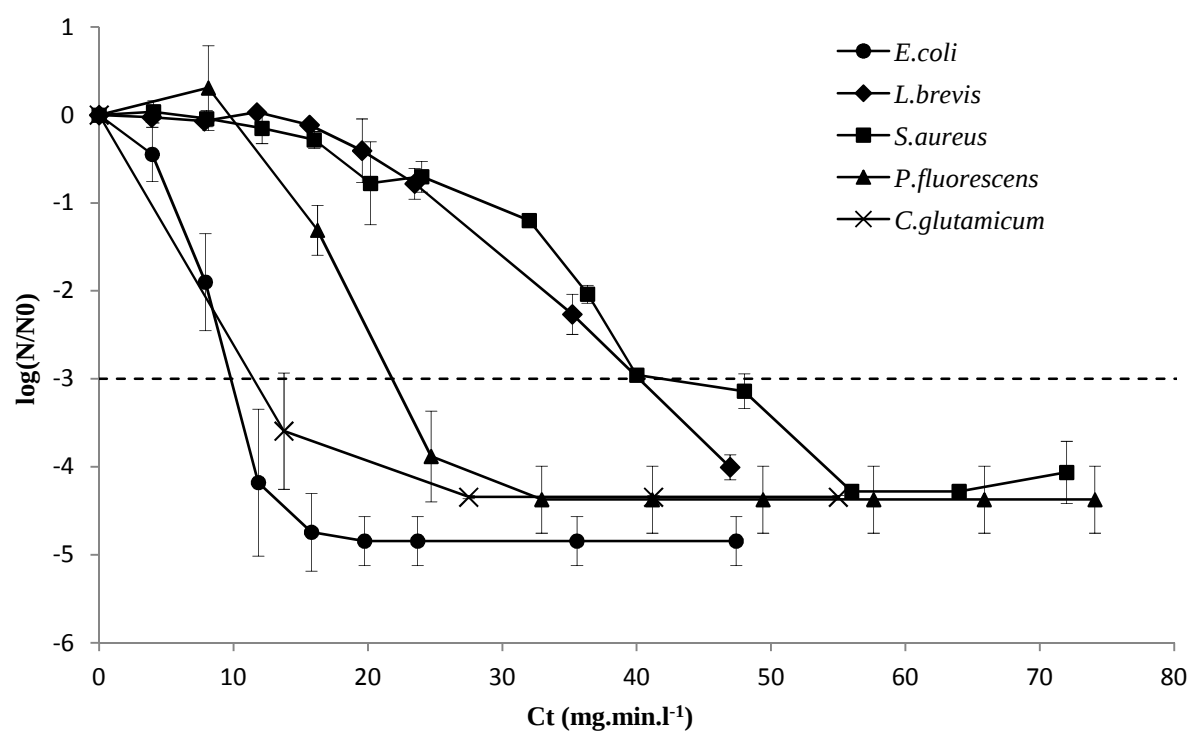
2b

 Y_2 against X_1 and X_2 for $X_3 = -1$ and $X_4 = -1$  Y_1 against X_3 and X_4 for $X_1=+1$ and $X_2=-1$  Y_2 against X_3 and X_4 for $X_1 = -1$ and $X_2 = -1$ 

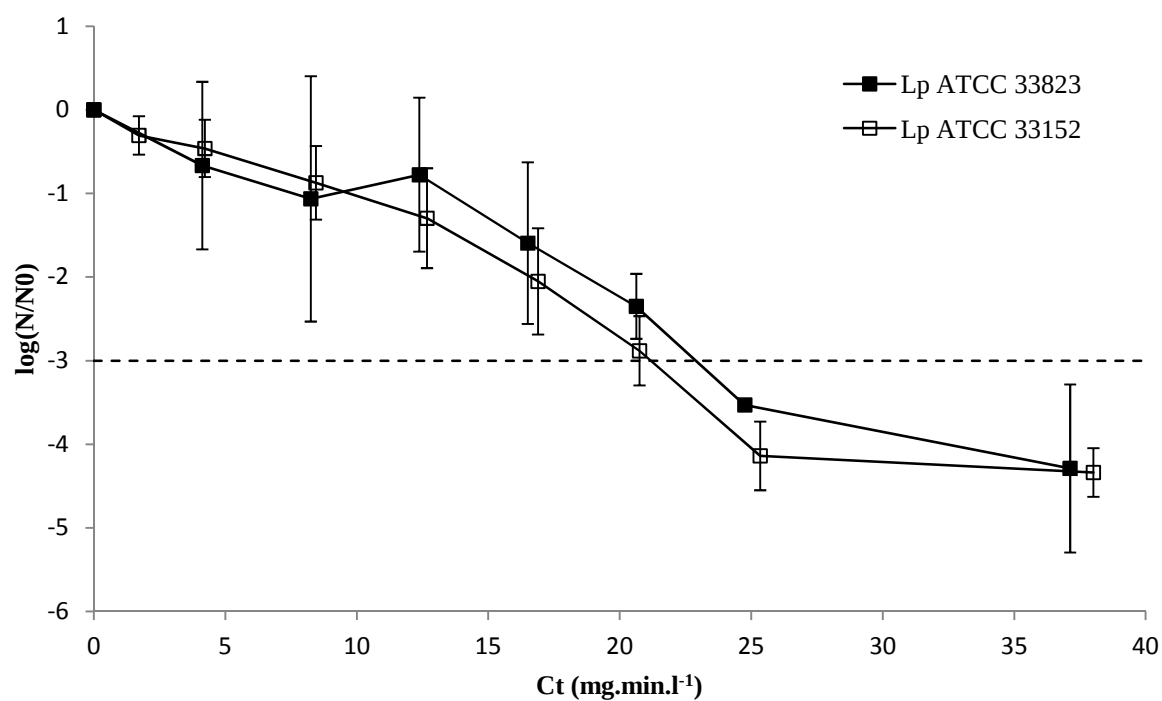
A sample of the effects of experimental factors on responses: response surface plot (left) and its contour plots (right) of interactions between variables (temperature and pH at the top; initial monochloramine and bacteria concentrations below) on the time necessary to inactivate 3-log units of bacteria, $Y_1 = t_{99.9\%}$ (Figure 2a) and on the activity of monochloramine, $Y_2 = n$ (Figure 2b).

FIGURE 3

3a

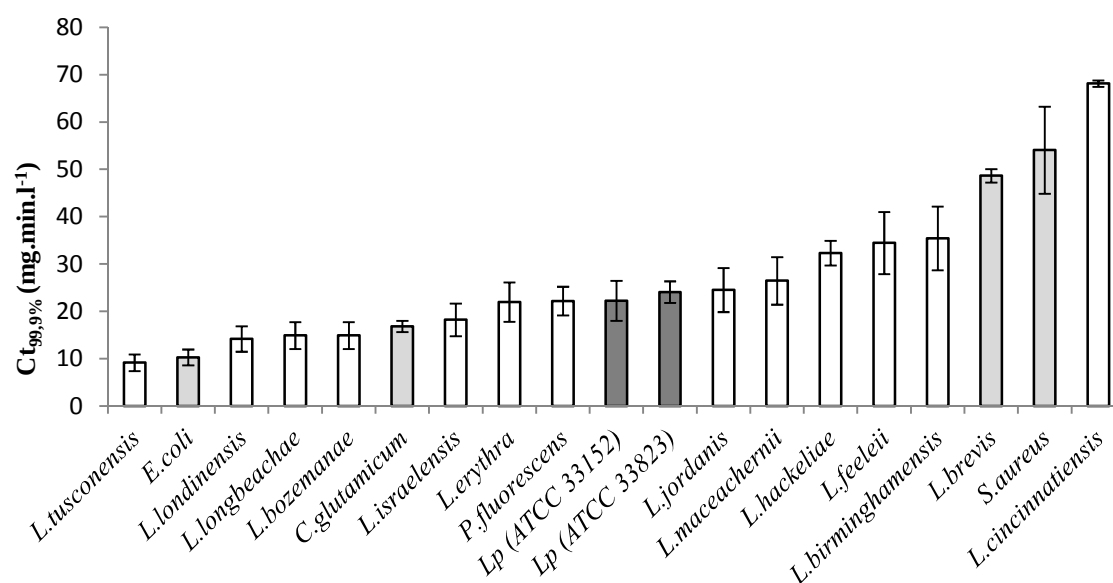


3b



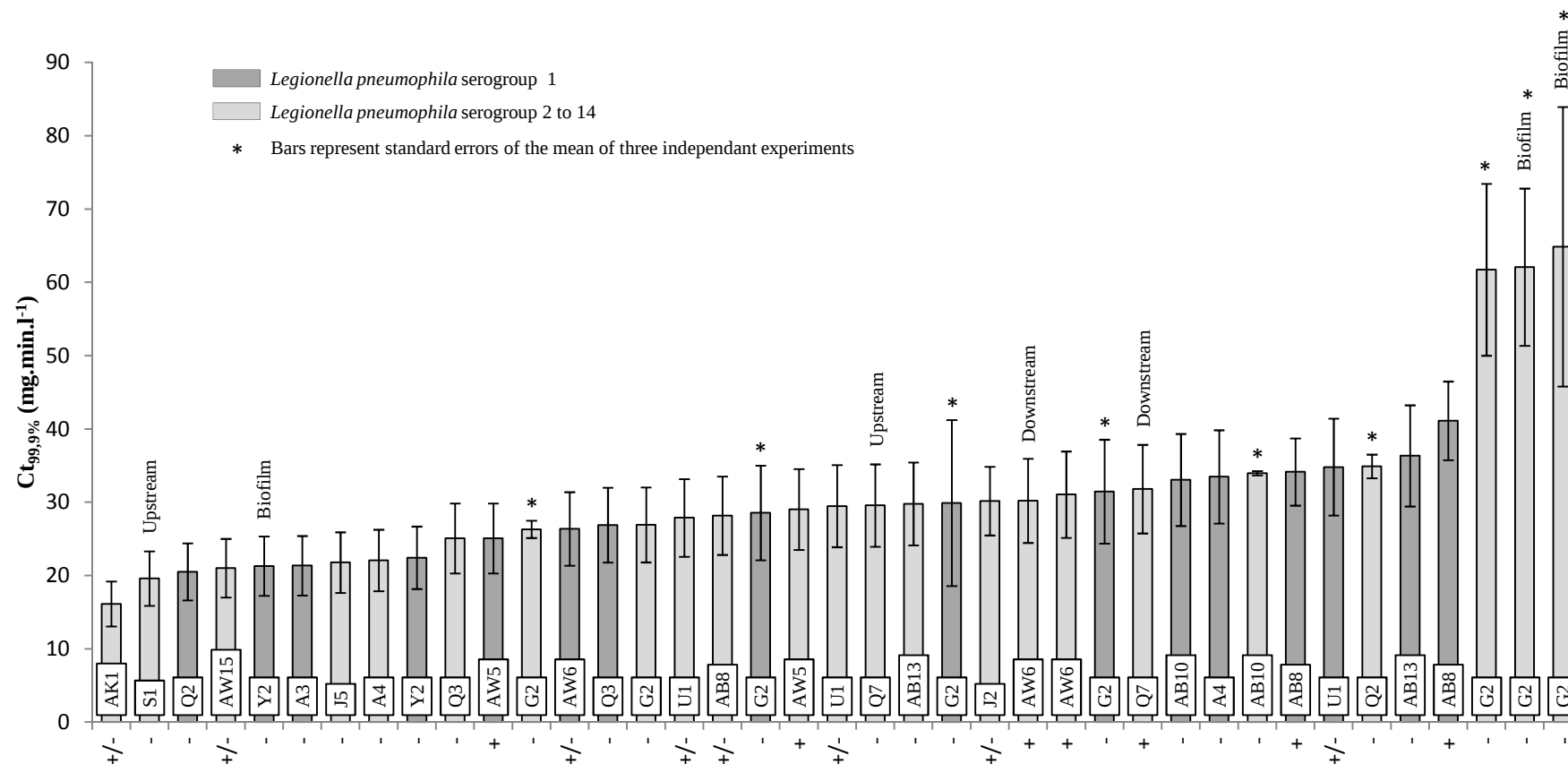
Reduction of non-*Legionella* bacteria (Figure 3a) and *Legionella pneumophila* ATCC 33152 and ATCC 33823 (Figure 3b) cultivability after monochloramine treatments. Bars represent standard errors of the means of the three independent experiments.

FIGURE 4



$Ct_{99.9\%}$ values from the monochloramine treatment of non-*Legionella* and *Legionella* strains from the Pasteur Institute Collection. Bars represent standard errors of the method (19%) except for non-*Legionella* bacteria and *L. hackeliae* and *L. cincinnatiensis* for which bars represent standard errors of the mean of three independent experiments.

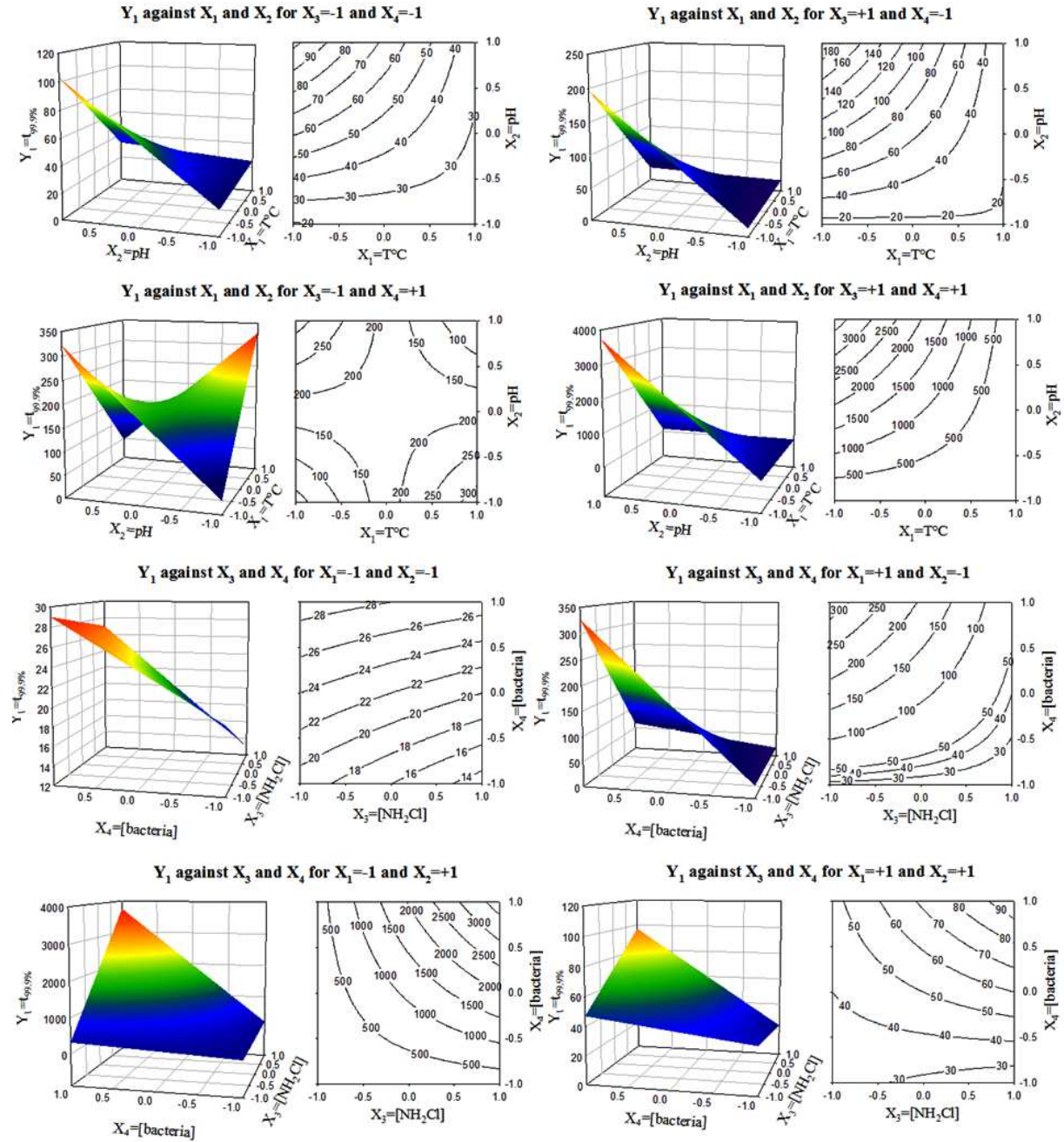
FIGURE 5

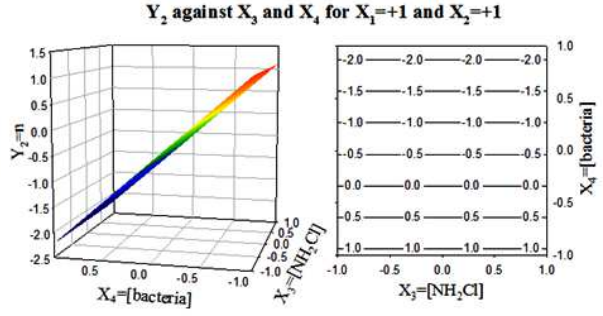
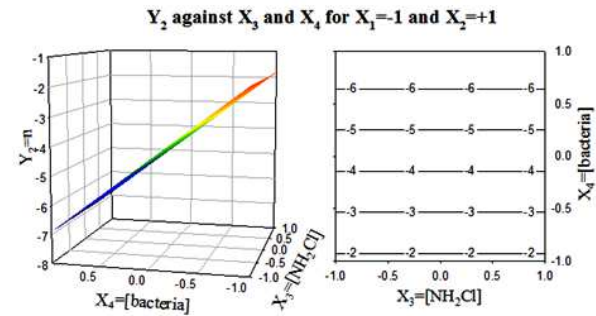
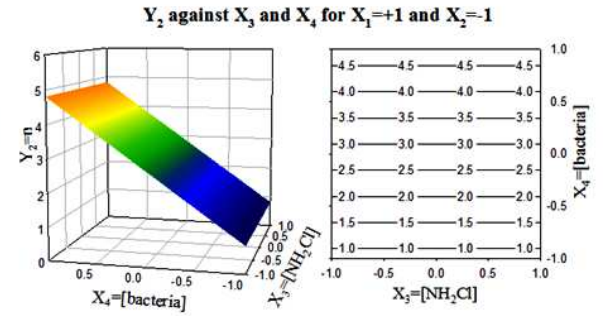
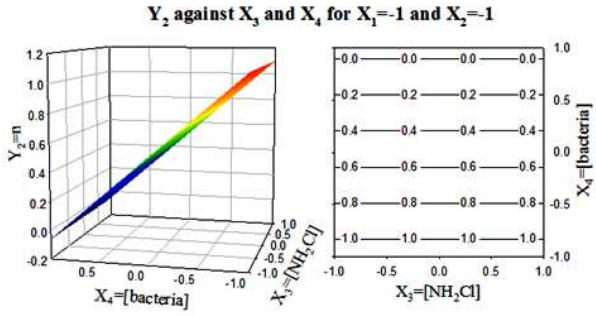
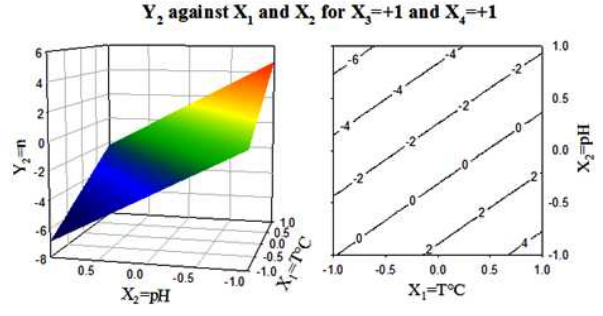
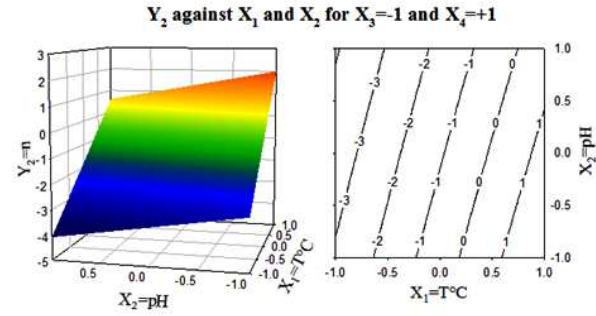
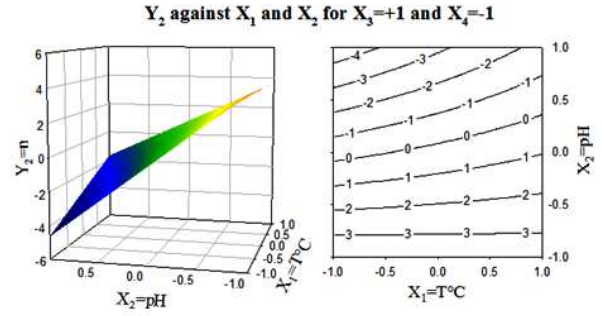
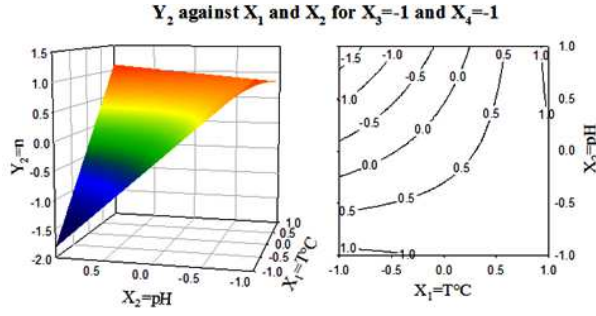


Ct_{99.9%} values from the monochloramine treatment of environmental *Legionella pneumophila* strains isolated during various treatment conditions (- without treatment, + during treatment, +/- between two treatment phases). Strains were collected from water or biofilm; upstream, inside or downstream from the cooling circuits. Tags represent their IRS-PCR profiles.

FIGURE S1

Response surface plots (left) and contour plots (right) of interactions between two variables (temperature and pH or initial monochloramine and bacterial concentrations), while the other two variables are maintained at extreme levels, on the time necessary to inactivate 3-log units of bacteria, $Y_1 = t_{99.9\%}$ and on the activity of monochloramine, $Y_2 = n$.





CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble de cette étude, portant sur l'écologie des légionelles dans l'eau des CRF des CNPE en bord de Loire, avait pour objectif principal d'expliquer d'un point de vue écologique les variations de concentrations en *L. pneumophila* cultivables observées dans les CRF, que ce soit en présence ou non de traitement à la monochloramine. Elle a permis, tout d'abord, de quantifier et de qualifier la diversité des *L. pneumophila* cultivables présentes dans les CRF et de mettre en relation cette diversité avec l'évolution des concentrations en *L. pneumophila* déterminées par la méthode culturale préconisée par la réglementation. La comparaison de la dynamique des communautés de *L. pneumophila* cultivables dans les CRF des quatre CNPE bord de Loire permet de déterminer si l'écologie des légionelles répond systématiquement de la même manière à différents facteurs abiotiques et biotiques ou si elle dépend de mécanismes locaux spécifiques des sites. Pour chaque CNPE, l'influence de plusieurs facteurs physico-chimiques et microbiologiques sur la diversité, la dynamique et les concentrations en *L. pneumophila* cultivables, a été étudiée en conditions réelles dans l'objectif d'identifier des paramètres moteurs des concentrations relevées en CRF. L'étude de la dynamique des communautés de *L. pneumophila* dans des CRF traités à la monochloramine permet de mieux comprendre les phénomènes de persistance des légionelles en présence de biocide et les rapides recolonisations observées après arrêt des traitements. L'hypothèse d'une sélection de souches résistantes à la monochloramine dans les CRF traités, pouvant expliquer les phénomènes cités précédemment, a été également testée par des études en laboratoire. Ce chapitre recense les principaux résultats apportés par cette étude, discute les choix méthodologiques réalisés et décrit les perspectives d'étude possibles suite à ce travail.

1. DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DES COMMUNAUTÉS DE *L. PNEUMOPHILA* CULTIVABLES

Les communautés de *L. pneumophila* cultivables présentes dans les quatre CNPE sont toutes composées par un nombre important de sous-populations. Bien que la richesse de ces communautés présente une forte évolution annuelle, leur structure reste stable avec une part importante de la communauté qui est représentée par des populations minoritaires. L'évolution temporelle de ces communautés semble être site-spécifique puisqu'à Belleville, à l'inverse du CNPE de Dampierre, la composition en sous-populations de la communauté de *L. pneumophila* évolue de manière saisonnière. Les analyses statistiques ont montré que cette saisonnalité est due à un certain nombre de sous-populations, telles qu'A3, AB8, AB13 et AB22, qui dans certaines conditions physico-chimiques régulent la composition de l'ensemble de la communauté de légionelles. Malgré la co-occurrence de ces sous-populations dans les CRF des CNPE de Belleville et Dampierre, aucune saisonnalité n'a pu être mise en évidence à Dampierre.

Il apparaît que l'évolution temporelle de la composition et de la structure des communautés de *L. pneumophila* dans chacun des CNPE soit dirigée par des mécanismes intra-communautaires importants et ne soit liée à aucun des facteurs abiotiques ou biotiques suivis. Cependant, les paramètres abiotiques, et plus précisément ceux liés à la saison, pourraient influencer indirectement la composition et la structure des communautés par la régulation des interactions entre sous-populations. Les différentes sous-populations présenteraient des sensibilités variables aux paramètres abiotiques. De plus, alors que les sous-populations liées à l'évolution temporelle de la structure et de la

composition des communautés sont présentes dans plusieurs CNPE, celles-ci ne présentent pas nécessairement les mêmes effets sur la dynamique des légionelles selon le site étudié. La dynamique des communautés de *L. pneumophila* serait donc régulée, à la fois, par des mécanismes intra-communautaires, mais également, de manière indirecte, par des facteurs site-spécifiques.

Peu d'études sont disponibles sur la variation temporelle des communautés de légionelles. L'étude de Parthuisot *et al.* (2010) a permis de comparer la dynamique temporelle des communautés de légionelles à différentes stations de prélèvement du Tech. Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux obtenus lors de notre étude. En effet, cette étude montre que la composition en espèces des communautés de légionelles présente une dynamique saisonnière localisée à certains points de prélèvements. Il semble que les communautés de légionelles sont sensibles aux variations saisonnières des conditions environnementales mais que l'impact des facteurs de saison peut être différent selon la localisation géographique, notamment de part les conditions hydrauliques de la rivière au point de prélèvement (Fliermans, 1996).

Des études supplémentaires visant à caractériser l'effet des conditions environnementales sur les interactions entre sous-populations qui seraient, pour partie, à l'origine de la structure des communautés mais aussi de l'évolution des concentrations (voir chapitre suivant), seraient pertinentes en pilote sur des eaux de CRF différents, pour mesurer l'effet des paramètres physico-chimiques, notamment ceux liés à la saison, sur les interactions entre sous-populations et les réponses observées à l'échelle de la communauté (diversité, structure, concentration). Elles permettraient également de confirmer ou non la spécificité locale des interactions entre sous-populations. Associée à des expériences *in vitro* de détermination de la sensibilité des différentes sous-populations aux paramètres abiotiques de saison, l'ensemble de cette étude pourrait permettre d'identifier la nature des liens entre les sous-populations de légionelles et les paramètres abiotiques (lien direct ou indirect).

Sur les 114 sous-populations détectées sur l'ensemble des CNPE ainsi qu'en amont et aval des installations, il apparaît que certaines ont une distribution multi-sites (50%) alors que d'autres semblent être mono-sites (50%). Certaines sous-populations peuvent être détectées sur une large portion de la Loire, cependant le manque de prélèvements en rivière sur l'ensemble du cours d'eau ne permet pas d'établir clairement la dynamique spatiale des sous-populations le long d'un profil longitudinal. **Ainsi, sur la Loire, il semble coexister deux types de sous-populations, les site-spécifiques et les pluri-sites. La distribution spatiale des sous-populations de *L. pneumophila* à l'échelle du bassin versant de la Loire semble être variable et dépendante des souches.** Par ailleurs, la comparaison des dynamiques des légionelles dans les quatre CNPE étudiés a mis en évidence des différences significatives entre les sites de Belleville et Dampierre, d'un côté, et les sites de St Laurent et Chinon de l'autre. Bien que la richesse et la diversité des communautés des quatre sites soient comparables, leur structure et leur composition sont significativement différentes. A l'échelle des sites, il est apparu au cours de cette étude, que les communautés de légionelles issues de deux tranches différentes sur un même site géographique présentent de fortes similitudes, à la fois en terme de richesse, de diversité et de structure de la communauté, mais aussi concernant le type de sous-populations présentes.

Différentes études réalisées dans des systèmes d'eau artificiels ont déjà montré que les souches de *L. pneumophila* étaient spécifiques de leur origine géographique voir de

l'installation étudiée (Sabria *et al.*, 2001; Amemura-Maekawa *et al.*, 2005; Garcia-Nunez *et al.*, 2006; Ragull *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2008). En complément, des études ont montré que toutes les souches de légionelles semblent ne pas présenter la même distribution géographique (Aurell *et al.*, 2003; Mekhour *et al.*, 2012). Aurell *et al.* (2003) ont analysé la distribution de la souche *L. pneumophila* sérotype 1 souche Paris par l'identification du pulsotype de plus 690 isolats. Ils ont montré que ces souches, présentant le même profil PFGE, avaient une distribution environnementale répandue à l'échelle française, européenne voire mondiale.

Une hypothèse émanant de ces résultats serait que toutes les sous-populations de légionelles sont naturellement présentes dans l'environnement et qu'une pression de sélection spécifique à chaque installation sélectionne différentes sous-populations. Une étude réalisée par Parthuisot *et al.* (2010), semble supporter cette hypothèse. En effet, bien que réalisé dans une rivière présentant des caractéristiques bien différentes de la Loire, et avec pour objectif d'analyser la diversité des espèces de légionelles, les communautés en amont et en aval de la rivière sont identiques même après modification de leur écosystème par des installations anthropiques.

L'évolution de la qualité d'eau le long de la Loire pourrait également être à l'origine de cette séparation. Cependant, la qualité de l'eau des CRF pendant la durée de l'étude n'a pas été significativement différente entre le quatre CNPE étudiée et sur les paramètres abiotiques mesurés. **A l'échelle de l'étude réalisée, il apparaît ainsi que l'eau des CRF des CNPE constitue un écosystème particulier qui pourrait dépendre de la structure des circuits (type de matériau, type de TAR) et qui sélectionne certaines sous-populations naturellement présentes dans l'environnement naturel représentant une communauté de légionelles propres à chaque type de circuit. Cette hypothèse nécessite d'être confirmée ou infirmée expérimentalement.**

Bien que l'eau des circuits de refroidissement soit directement rejetée dans l'environnement, il n'est pas établi aujourd'hui que la modification possible de l'écosystème à l'intérieur du circuit ait un impact sur l'écosystème en aval de l'installation, dans la rivière.

Une comparaison entre les communautés en amont, dans le circuit ainsi qu'en aval des installations, à différentes distances du rejet (sur installation réelle ou sur pilote), permettrait de mesurer l'étendue géographique d'un rejet microbiologique des CNPE, et de tester la résilience des communautés de légionelles. Cependant, de telles études nécessiteraient un effort méthodologique important afin d'échantillonner un nombre suffisant de légionelles en rivière. Une méthode de caractérisation des communautés sans étape de culture, adaptée aussi bien à une eau naturelle de type rivière présentant de faible concentration en légionelles mais aussi à une eau complexe de type eau brute de CRF présentant de forte concentration en légionelle, serait idéale mais nécessiterait un gros effort de développement. De même, une comparaison des communautés de légionelles entre deux circuits de refroidissement alimentés par la même eau brute mais présentant des conceptions différentes, permettrait de tester l'impact des éléments structuraux des circuits sur les populations de légionelles. Il pourrait être envisagé de réaliser ce genre d'étude sur pilote en utilisant la même méthode que celle utilisée pour réaliser les travaux de cette thèse.

2. REGULATION DE LA CONCENTRATION EN LEGIONELLES

Que ce soit dans le circuit de refroidissement de Belleville ou Dampierre, il apparaît que les mécanismes de régulation des concentrations en légionelles présentent de fortes similarités. Tout d'abord, aucun lien entre la concentration en légionelle et le degré de diversité et la structure de la communauté n'a été détecté. Il semble que les concentrations en *L. pneumophila* cultivables soient sous l'influence, directe ou indirecte, des paramètres de saison et qu'elles dépendent de l'évolution de certaines sous-populations, notamment les sous-populations minoritaires. D'après ces résultats, des mécanismes fins de régulation pourraient influencer de manière indirecte la concentration en légionelles. **En effet, l'évolution des sous-populations incriminées dans les variations de concentration en légionelles, semblent être influencée par des interactions souche-spécifiques avec des facteurs biotiques telles que les amibes et les *Pseudomonas*, et par des sensibilités souche-dépendantes aux facteurs abiotiques.** Au vu de ces résultats, il apparaît que les mécanismes de régulation des communautés de *L. pneumophila* cultivables, que ce soit en termes de diversité, de composition ou de concentration, sont multifactoriels. Le caractère souche-spécifique des sous-populations avec les facteurs abiotiques et biotiques semble prépondérant dans la régulation de la diversité, de la composition et de l'abondance de la communauté de *L. pneumophila* cultivable.

Le rôle des protozoaires, et notamment des amibes dans la survie et le développement des légionelles est aujourd'hui bien connu. Ils sont reconnus pour être des amplificateurs naturels des légionelles (Wadowsky *et al.*, 1991; Riffard *et al.*, 2003). L'internalisation et le taux de multiplication des légionelles sont des phénomènes qui semblent dépendre à la fois des espèces voir des souches de légionelles et d'amibes (Neumeister *et al.*, 1997; Steinert *et al.*, 2002; Declerck *et al.*, 2005; Declerck *et al.*, 2007a; Dey *et al.*, 2009).

La présence d'autres espèces bactériennes peut également influencer le développement des légionelles. Les mécanismes par lesquels ces autres micro-organismes influencent les communautés de légionelles sont méconnus. Une récente étude a montré que certains micro-organismes, comme *Escherichia coli* et *Aeromonas hydrophila*, présents naturellement dans l'environnement aquatique, pouvaient inhiber ou favoriser la multiplication de *L. pneumophila* en influençant, non pas le taux d'ingestion des légionelles dans les amibes, mais leur multiplication intra-amibienne (Declerck *et al.*, 2005). Certains micro-organismes, tels que les *Pseudomonas*, peuvent également impacter la survie des légionelles par la sécrétion de molécules anti-*Legionella* (Guerrieri *et al.*, 2007). De même, par un mécanisme encore inconnu, certains micro-organismes auraient la capacité de favoriser ou d'inhiber l'implantation des légionelles dans un biofilm, niche écologique favorable des légionelles (Guerrieri *et al.*, 2007; Guerrieri *et al.*, 2008).

Le rôle des phages dans le contrôle des populations de légionelles n'est, à ce jour, que théorique. Bien que les phages soient reconnus pour réguler la diversité et l'abondance des communautés bactériennes, une unique étude démontre la présence de phages spécifiques du genre *Legionella* mais ne démontre pas leur rôle dans la régulation des communautés de légionelles (Lammertyn *et al.*, 2008).

Par ailleurs, d'après la bibliographie, le lien entre les facteurs abiotiques, notamment la température, et la dynamique des populations de légionelles est à la fois direct et indirect. En effet, la survie et la croissance des légionelles sont directement reliées à la température

(Ohno *et al.*, 2003; Lasheras *et al.*, 2006) et les réactions des légionelles à différentes températures semblent souche-dépendantes (Konishi *et al.*, 2006). Dans l'environnement naturel, la relation entre la dynamique des sous-populations de légionelles et la température relève aussi d'un caractère indirect. En effet, plusieurs études montrent que la température régule les relations entre amibes et légionelles, influençant par cette voie, l'abondance des sous-populations de légionelles (Ohno *et al.*, 2008; Buse et Ashbolt, 2011). D'autres travaux ont mis en évidence une relation entre la saisonnalité des communautés bactériennes, en termes d'abondance et de composition, et la dynamique des bactériophages et des protozoaires (Fuhrman, 1999; Wommack et Colwell, 2000; Weinbauer, 2004; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004; Mühling *et al.*, 2005).

En raison de la dépendance espèce- voir souche-spécifique de l'interaction entre les légionelles et les protozoaires ainsi que de la forte spécificité de prédation des virus, les communautés de protozoaires et de virus pourraient réguler la diversité des communautés de légionelles et l'abondance des différentes sous-populations (Thingstad et Lignell, 1997; Fuhrman, 1999; Hahn et Höfle, 2001; Jurgens et Matz, 2002; Nichols, 2003; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004; Miki et Yamamura, 2005; Personnic *et al.*, 2006; Herndl *et al.*, 2008)

La dynamique des communautés de légionelles serait liée aux différences de sensibilité des sous-populations aux facteurs abiotiques, et notamment à la température, mais pourrait être aussi liée à la présence, la diversité, la composition et la saisonnalité des communautés virales, amibiennes (ou d'autres hôtes potentiels) et d'autres bactéries, qui réguleraient la diversité des communautés de légionelles et l'abondance des différentes sous-populations via la régulation des interactions entre micro-organismes.

Il apparaît donc essentiel, dans un premier temps d'étudier de manière détaillée, en laboratoire, les liens entre la dynamique des sous-populations de *L. pneumophila* et celle des communautés amibiennes et de déterminer la spécificité de leurs interactions. Dans cet objectif, en parallèle des travaux de cette thèse, un nombre conséquent d'isolats amibiens a été conservé dans le but de les identifier, à un niveau taxonomique au niveau de l'espèce voir de la souche, puis de comparer leur dynamique avec celle des *L. pneumophila*. Dans un deuxième temps, il serait intéressant de définir le rôle des bactériophages dans le contrôle des communautés de légionelles. La présence de phages spécifiques aux légionelles n'étant pas établie, une telle étude impliquerait tout d'abord la mise en évidence de la présence de ces micro-organismes dans l'eau des CRF des CNPE. La compréhension du rôle des phages dans la régulation des populations de légionelles impliquerait également d'étudier le caractère souche-spécifique de leur interaction. Enfin, l'analyse de l'influence des phages sur la diversité et l'abondance des sous-populations de légionelles pourrait être réalisée en réacteur, sur des communautés de légionelles artificielles. Enfin, il serait intéressant d'analyser l'ensemble des communautés bactériennes afin d'identifier certains micro-organismes qui présenteraient des liens avec la dynamique des communautés de légionelles dans le but d'analyser leur effet sur ces communautés. L'analyse des communautés microbiennes par pyroséquençage sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour cette thèse, pourrait permettre d'identifier des populations microbiennes évoluant parallèlement aux populations de légionelles. Suite à la caractérisation *in situ* de ces micro-organismes, des analyses en laboratoire permettraient de déterminer l'effet de ces populations sur les communautés de légionelles libres ou intra-amibiennes. Les effets des paramètres abiotiques, et notamment des paramètres de saison, devront systématiquement être pris en

considération dans l'analyse des interactions entre les communautés de légionelles et les autres micro-organismes, que ce soit les protozoaires, les virus ou les autres bactéries.

3. ECOLOGIE DES LEGIONELLES EN PRESENCE DE MONOCHLORAMINE ET SENSIBILITE CELLULAIRE AU BIOCIDES

L'utilisation du traitement à la monochloramine induit une modification générale de la communauté de légionelle : la concentration diminue jusqu'à être en dessous de la limite de détection de la méthode réglementaire (500 UFC/L), le degré de diversité chute (perte de 87% du nombre de sous-populations détectées) et la structure de la communauté change pour présenter une très forte dominance par une seule sous-population. Suite à la période de traitement et à la forte perturbation de la communauté de légionelles qui en résulte, il apparaît que celle-ci retrouve son état initial en termes de richesse spécifique, de diversité et de structure. Après le traitement, 40% des sous-populations présentes avant l'injection de la monochloramine sont détectées. La modification de la composition de la communauté de légionelles peut avoir plusieurs origines : l'effet du traitement à la monochloramine ou l'effet de la saison. Ce dernier entraîne les mêmes modifications de composition en sous-populations que dans les autres CNPE non traités (43% et 24% des sous-populations à Belleville et Dampierre, respectivement, persistent pendant cette période).

Ces résultats nous apprennent donc que la communauté planctonique de *L. pneumophila* cultivables semble capable de résilience. L'utilisation du biocide entraîne un changement au sein de la communauté mais cette perturbation est temporaire, la communauté de légionelles retrouve son état initial. Cette capacité de résilience implique une grande flexibilité de la part de la communauté de légionelles.

La propriété de résilience de la communauté de légionelles devra être confirmée par des études complémentaires en laboratoire. En effet, cette propriété suggère que l'utilisation de la monochloramine sur une courte période ne provoque pas d'effet long terme sur les communautés de légionelles. Cela pourrait signifier que les communautés de légionelles ne s'adaptent pas au stress chimique provoqué par la monochloramine, quelque soit le nombre de traitements appliqués. Selon ce principe, l'efficacité biocide de la monochloramine utilisée serait pérenne.

Cependant, face à un stress chimique, les bactéries sont capables d'adopter des mécanismes de survie pour se défendre de l'attaque des biocides. Parmi ces mécanismes, les bactéries peuvent entrer dans un état VBNC, intégrer un biofilm qui les protège physiquement, ou encore être internalisées par des protozoaires qui leur offrent une protection significative contre l'attaque des biocides.

Pour bien comprendre l'impact de la monochloramine sur les communautés de légionelles, l'étude de ces mécanismes de protection doivent être intégrés aux prochaines études. En effet, ils pourraient apporter des éléments de compréhension des phénomènes de recolonisation rapide des circuits de refroidissement, et de la capacité de résilience des communautés de légionelles. En outre, la mesure de la fraction des légionelles viables mais non cultivables permettrait de caractériser le statut physiologique de la communauté et de

déterminer le degré de stress engendré par l'utilisation de la monochloramine. De même, la comparaison de l'efficacité de la monochloramine sur des échantillons d'eau et de biofilm, ainsi que des légionelles libres et internalisées dans des protozoaires, devrait permettre de déterminer l'apport du biofilm et des protozoaires dans la protection des communautés de légionelles. Cependant, une étude récente réalisée par Dupuy *et al.* (2011) suggère que la monochloramine possède la même efficacité sur les légionelles intra-amibiennes que sur les légionelles libres.

Une identification des sous-populations de légionelles appartenant à la fraction VBNC, présentes dans le biofilm ou dans les amibes, lors de phase de traitement à la monochloramine, complèterait les résultats obtenus sur les sous-populations viables et cultivables présentes dans la phase eau et sur les mécanismes de recolonisation des circuits de refroidissement suite à l'arrêt des traitements. Ce type d'étude pourrait être effectué en laboratoire. Une méthode de dénombrement et d'identification de la fraction VBNC en phase planctonique et sessile devra être mise en place.

D'autres mécanismes de résistance bactérienne peuvent expliquer la persistance de certaines légionelles pendant l'utilisation de la monochloramine. La résistance bactérienne innée, qui dépend de propriétés naturelles des micro-organismes (membrane cellulaire, systèmes d'efflux ou de dégradation intracellulaire du biocide), ou les mécanismes d'adaptation phénotypique (réponses des cellules bactériennes par une expression génétique particulière suite au stress engendrée par le biocide), pourraient permettre aux légionelles de lutter efficacement contre l'attaque des biocides et de survivre en présence de monochloramine. La sensibilité intrinsèque des légionelles détectées pendant l'utilisation de la monochloramine a été comparée avec celle de souches isolées en dehors de phase de traitement.

Les sous-populations de *L. pneumophila* présentent une grande variabilité de sensibilité à la monochloramine. En effet, pour inactiver 99.9% des bactéries, les sous-populations les plus tolérantes nécessitent un temps de contact théorique quatre fois plus long avec le biocide que les sous-populations les plus sensibles. **Cependant, malgré cette grande variabilité, en considérant le temps de séjour des sous-populations bactériennes dans les CRF et la concentration en monochloramine utilisée, celle-ci reste efficace sur les sous-populations les plus tolérantes au biocide. De plus, aucun lien entre la sensibilité des sous-populations et l'utilisation de la monochloramine, que ce soit de manière séquentielle ou continue, n'a été mis en évidence, signifiant que la monochloramine utilisée dans les circuits de refroidissement ne sélectionne pas de sous-populations plus tolérantes.** La mesure de la sensibilité intrinsèque des légionelles combinée avec l'identification génomique des sous-populations suggère que les différences de sensibilité pourraient être d'origine génétique. **Malgré la présence de sous-populations de légionelles révélant un certain degré de tolérance à la monochloramine, ces sous-populations n'ayant jamais été détectées dans des installations utilisant le biocide, il semble que cette propriété ne constitue pas un avantage écologique pour les légionelles.** Cependant, l'identification des légionelles par IRS PCR apporte une information sur les variations génétiques entre souches mais ne révèle pas des différences d'expression génique.

Une caractérisation précise du mode d'action de la monochloramine sur les bactéries et des réponses cellulaires des légionelles face à l'action du biocide permettrait de mieux comprendre la persistance de certaines sous-populations et de déterminer les mécanismes

de survie des légionelles mis en place. Comparer l'expression génétique et les sensibilités de différentes sous-populations sessiles et planctoniques lors de l'utilisation de la monochloramine permettrait d'identifier les mécanismes de survie des légionelles dans les circuits de refroidissement traités à la monochloramine, et de distinguer les phénomènes de résistance dus à la protection environnementale et à la réponse cellulaire.

4. PERSPECTIVES GENERALES

La méthode de dénombrement des légionelles par la culture sur milieu gélosé est la méthode de référence utilisée pour le suivi réglementaire des concentrations dans les CRF. Cependant, il est aujourd'hui établi que la majorité des espèces bactériennes présentes dans l'eau ne possède pas la capacité de croître sur un milieu de culture. Dans une communauté microbienne aquatique, la fraction des micro-organismes cultivables ne représente que 3% au maximum de la totalité des micro-organismes présents (Amman *et al.*, 1995; Theron et Cloete, 2000; Gilbride *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2008). **La méthode de dénombrement par la culture ne prend donc pas en compte la fraction VBNC des légionelles. De plus, le milieu de culture (GVPC) utilisé et la température d'incubation choisie (37°C) sélectionnent l'espèce *L. pneumophila* au détriment des autres espèces de légionelles. Par cette méthode, le dénombrement est donc restreint aux populations cultivables appartenant à l'espèce *L. pneumophila*.** Cependant, l'un des objectifs de cette thèse était de mettre en regard les taux de concentrations relevés dans les circuits de refroidissement et mesurés par la méthode de culture, telle que préconisée par la réglementation, avec la diversité et la dynamique des légionelles. Ainsi, analyser la fraction cultivable des populations de légionelles répond directement à cet objectif et s'inscrit dans la démarche générale de l'étude sur l'écologie des légionelles dans les circuits de refroidissement.

Pour compléter notre vision actuelle de l'écologie des légionelles dans les CRF, en parallèle de l'étude présentée dans ce rapport, une analyse de la diversité de l'ensemble de la communauté aquatique présente dans l'eau des CRF sans étape de culture a été initiée. La méthode choisie a été d'analyser la diversité moléculaire des légionelles, des autres bactéries et des eucaryotes dans les prélèvements par pyroséquençage. Cette étude permettra, à la fois d'intégrer la fraction VBNC des légionelles dans l'analyse de leur diversité et de leur dynamique, de mettre en regard la dynamique de l'espèce *L. pneumophila* avec les autres espèces de *Legionella*, mais aussi d'identifier en partie les autres micro-organismes présents dans l'eau des CRF et de déterminer lesquels seraient susceptibles d'avoir un lien avec la dynamique des légionelles. Cette étude est en cours de réalisation et est effectuée en partenariat avec le Laboratoire d'Océanographie Microbienne (LOMIC) de Banyuls-sur-Mer.

La méthode choisie pour l'identification des souches de légionelles, l'Infrequent Restriction Site PCR (IRS PCR), permet, après culture, d'identifier les souches de légionelles à un niveau taxonomique inférieur à celui de l'espèce. **Cette méthode, bien que discriminante entre les espèces et sous-espèces, ne permet pas d'établir leur phylogénie.**

Il serait intéressant de déterminer les relations phylogénétiques entre les sous-populations de *L. pneumophila* afin de qualifier la proximité (ou l'éloignement) génétique entre sous-populations qui pourrait caractériser les différentes communautés et être signe d'une spécialisation fonctionnelle des communautés de *L. pneumophila* dans un environnement

donné. De même, la détermination des liens phylogénétiques entre sous-populations pourrait être utile pour identifier des possibles acquisitions de caractères génétiques (mutations, transferts horizontaux) le long d'un gradient longitudinal ou temporel, sous l'effet de la monochloramine, par exemple.

L'étude décrite dans le présent rapport a été réalisée sur une période de un an, à raison d'un prélèvement par mois dans chacun des quatre CNPE de la Loire. **Bien que les évolutions des taux de concentration dans les circuits de refroidissement sont saisonnières et suivent une évolution annuelle, il n'est pas établi que les communautés de légionelles suivent également cette dynamique. De plus, la vitesse d'évolution des communautés de *L. pneumophila* n'a pas été étudiée et ne correspond pas nécessairement au pas de temps choisi pour réaliser cette étude.**

Il apparaît donc nécessaire de tester la variabilité interannuelle de la dynamique des populations de légionelles, ce qui permettrait de confirmer les résultats issus de ces travaux et de déterminer si les communautés de légionelles possèdent une dynamique cyclique ou linéaire. De même, déterminer la vitesse d'évolution des communautés de légionelles serait intéressant pour caractériser la vitesse de réaction des communautés de *L. pneumophila* aux changements environnementaux (par exemple, la réaction de la communauté aux événements de pluie ou aux variations de débit est-elle immédiate ou se ressent-elle ultérieurement ?). Une telle étude pourrait être réalisée en pilote où une caractérisation de la communauté avec un pas de temps court (journalière) face à des modifications environnementales serait réalisée.

La stratégie d'échantillonnage adoptée pour cette étude a été de prélever l'eau du bassin froid des CRF des CNPE. **Or, le biofilm semble constituer le réservoir principal des micro-organismes et des légionelles dans les milieux aquatiques. Le mode de vie sessile semble présenter des avantages vis-à-vis du mode de vie planctonique. Dans les circuits de refroidissement, le biofilm est suspecté être la source des légionelles détectées dans la phase eau.** Les mécanismes de détachement des légionelles sessiles vers la phase planctonique sont inconnus. Le décrochage mécanique de portion de biofilm pourrait être à l'origine d'une augmentation des concentrations de légionelles dans l'eau mais d'autres mécanismes, tels que des compétitions avec d'autres micro-organismes, le broutage par les protozoaires, pourraient également expliquer ces phénomènes. De plus, le biofilm est un lieu privilégié d'échange entre les micro-organismes. Les différents compartiments microbiens présentent une proximité spatiale dans le biofilm qui favorise les interactions entre micro-organismes, que ce soit la compétition pour les nutriments ou pour un hôte support de prolifération, la diffusion de molécules potentialisant ou inhibant la survie et le développement des légionelles, le transfert de gènes entre micro-organismes ou encore la communication cellulaire et le Quorum Sensing.

De même, l'échantillonnage a été réalisé uniquement dans le bassin froid des CRF. Or, les différents compartiments au sein des CRF (compartiments chauds et froids) présentent des caractéristiques physico-chimiques différentes. Le lieu support de la prolifération des légionelles n'a pas été identifié à ce jour.

Il paraît donc indispensable d'analyser les communautés bactériennes au sein de la phase biofilm et d'identifier les liens entre les phases sessiles et planctoniques. L'identification du terme source des légionelles dans les CRF, à la fois en termes de matrice (eau ou biofilm)

mais aussi de localisation géographique au sein des CRF (compartiments chauds ou froids) compléterait nos connaissances actuelles sur l'écologie des légionelles dans les CRF.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abu Kwaik Y., Eisenstein BI, Engleberg NC.** (1993) Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infection and Immunity* **61** (4): 1320-1329.
- Abu Kwaik Y., Gao L.Y., Harb O.S. et Stone B.J.** (1997) Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (gspA) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Molecular Microbiology* **24** (3): 629-642.
- Abu Kwaik Y., Gao L.Y., Stone B.J., Venkataraman C. et Harb O.S.** (1998) Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (9): 3127-3133.
- Achouak W., Heulin T, Pagès JM.** (2001) Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiology Letters* **199** (1): 1-7.
- Acinas S.G., Sarma-Rupavtarm R., Klepac-Ceraj V. et Polz M.F.** (2005) PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (12): 8966-8969.
- Adeleke A., Pruckler J., Rowbotham T., Halablab M. et Fields B.** (1996) *Legionella*-like amebal pathogens—phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerging Infectious Diseases* **2** (3): 225-230.
- AFNOR Standard NF T90-431/A1** (2006) Water quality - Detection and enumeration of *Legionella* spp and *Legionella pneumophila* - Method by direct inoculation and after concentration by membrane filtration or centrifugation.
- Afshar B., Fry N.K., Bellamy W., Underwood A.P. et Harrison T.G.** (2007) External quality assessment of a DNA sequence-based scheme for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* by an international network of laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* **45** (10): 3251-3256.
- Aguilar C., Vanegas C. et Klotz B.** (2011a) Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Dairy Research* **78** (02): 136-143.
- Aguilar M., Spiegel F. et Lado C.** (2011b) Microhabitat and climatic preferences of protosteloid amoebae in a region with a Mediterranean climate. *Microbial Ecology* **62** (2): 361-373.
- Alary M. et Joly J.R.** (1991) Risk factors for contamination of domestic hot water systems by legionellae. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (8): 2360-2367.
- Albrich J.M. et Hurst J.K.** (1982) Oxidative inactivation of *Escherichia coli* by hypochlorous acid: rates and differentiation of respiratory from other reaction sites. *FEBS Letters* **144** (1): 157-161.
- Allard K.A., Dao J., Sanjeevaiah P., McCoy-Simandle K., Chatfield C.H., Crumrine D.S., et al.** (2009) Purification of legiobactin and importance of this siderophore in lung infection by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **77** (7): 2887-2895.
- Alleron L., Merlet N., Lacombe C. et Frère J.** (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Current Microbiology* **57** (5): 497-502.
- Alli O.A.T., 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** (11): 6431-6440.
- Allison D.G. et Sutherland I.W.** (1987) The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Journal of General Microbiology* **133** (5): 1319-1327.
- Allison S.D. et Martiny J.B.H.** (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105** (Supplement 1): 11512-11519.
- Almeida W., Vieira R., Cardoso A., Silveira C., Costa R., Gonzalez A., et al.** (2009) Archaeal and bacterial communities of heavy metal contaminated acidic waters from zinc mine residues in Sepetiba Bay. *Extremophiles* **13** (2): 263-271.
- Amblard C., Boisson J.C., Bourdier G., Fontvieille D., Gayte X. et Sime-Ngando T.** (1998) Microbial ecology in aquatic systems: a review from viruses to protozoa. *Revue des Sciences de l'Eau* **11** (Special): 145-162.
- Amemura-Maekawa J., Kura F., Chang B. et Watanabe H.** (2005) *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiology and Immunology* **49** (12): 1027-1033.
- Aminov R.I.** (2011) Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology* **2**.
- Amman R.I., Ludwig W. et Schleifer K.H.** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59** (1): 143-169.
- 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** (2): 167-178.
- Arata S., Kasai N., Klein T.W. et Friedman H.** (1994) *Legionella pneumophila* growth restriction and cytokine production by murine macrophages activated by a novel *Pseudomonas* lipid A. *Infection and Immunity* **62** (2): 729-732.
- Arnitz R., Nagl M. et Gottardi W.** (2009) Microbicidal activity of monochloramine and chloramine T compared. *Journal of Hospital Infection* **73** (2): 164-170.
- Association Française de Normalisation** (2006) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila*: Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. NF T90-431.
- Atkinson R.M., Mitchell L.S. et Tuomanen E.** (2000) Mechanisms of tolerance to Vancomycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Infections in Medicine* **17** (12): 793-801.
- Atlas R.M.** (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology* **1** (4): 283-293.
- Aurell H., Etienne J., Forey F., Reyrolle M., Girardo P., Farge P., et al.** (2003) *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *Journal of Clinical Microbiology* **41** (7): 3320-3322.
- Aurell H., Farge P., Meugnier H., Gouy M., Forey F., Lina G., et al.** (2005) Clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 cannot be distinguished by sequence analysis of two surface protein genes and three housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (1): 282-289.

B

- Babi K.G., Koumenides K.M., Nikolaou A.D., Makri C.A., Tzoumerkas F.K. et Lekkas T.D.** (2007) Pilot study of the removal of THMs, HAAs and DOC from drinking water by GAC adsorption. *Desalination* **210** (1-3): 215-224.
- Badouard C., Masuda M., Nishino H., Cadet J., Favier A. et Ravanat J.L.** (2005) Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to tandem mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation. *Journal of Chromatography B* **827** (1): 26-31.
- Bandyopadhyay P. et Steinman H.M.** (1998) *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the katB gene and studies of KatB function. *Journal of Bacteriology* **180** (20): 5369-5374.

- Bandyopadhyay P. et Steinman H.M.** (2000) Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the katA gene and studies of KatA function. *Journal of Bacteriology* **182** (23): 6679-6686.
- Bansal-Mutalik R. et Nikaido H.** (2011) Quantitative lipid composition of cell envelopes of *Corynebacterium glutamicum* elucidated through reverse micelle extraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** (37): 15360-15365.
- Bansal N.S. et McDonell F.** (1997) Identification and DNA fingerprinting of *Legionella* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **35** (9): 2310-2314.
- 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** (2): 422-424.
- Barbeau J., Gauthier C. et Payment P.** (1998) Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **44** (11): 1019-1028.
- Bargellini A., Marchesi I., Righi E., Ferrari A., Cencetti S., Borella P. et Rovesti S.** (2011) Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Research* **45** (6): 2315-2321.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (8): 2420-2425.
- Barker J., Lambert P.A. et Brown M.R.W.** (1993) Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **61** (8): 3503-3510.
- Barker J., Scaife H. et Brown M.R.** (1995) Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39** (12): 2684-2688.
- Barrette W.C., Albrich J.M. et Hurst J.K.** (1987) Hypochlorous acid-promoted loss of metabolic energy in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **55** (10): 2518-2525.
- Barrette W.C., Hannum D.M., Wheeler W.D. et Hurst J.K.** (1989) General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry* **28** (23): 9172-9178.
- Bartram J., WHO et IWA** (2009) *Water safety plan manual: step-by-step risk management for drinking water suppliers*.
- Batté M., Mathieu L., Laurent P. et Prévost M.** (2003) Influence of phosphate and disinfection on the composition of biofilms produced from drinking water, as measured by fluorescence in situ hybridization. *Canadian Journal of Microbiology* **49** (12): 741-753.
- 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** (2): 597-600.
- Bender L., Ott M., Marre R. et Hacker J.** (1990) Genome analysis of *Legionella* spp. by orthogonal field alternation gel electrophoresis (OFAGE). *FEMS Microbiology Letters* **72** (3): 253-258.
- Benndorf D., Balcke G.U., Harms H. et von Bergen M.** (2007) Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME Journal* **1** (3): 224-234.
- Bennett S. et Bentham R.** (2006) Effects of seawater concentration and temperature on the survival of *Legionella pneumophila* serogroup 1. In *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. Cianciotto, N.P., Abu Kwaik, Y., Edelstein, P.H., Fields, B.S., Geary, D.F., Harrison, T.G., et al. (eds). Washington DC: **ASM Press**, pp. 420-422.
- Bentham R.H. et Broadbent C.R.** (1993) A model for autumn outbreaks of Legionnaires' disease associated with cooling towers, linked to system operation and size. *Epidemiology and Infection* **111** (2): 287-295.
- Beranov-Giorgianni S.** (2003) Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22** (5): 273-281.
- Berendt R.F.** (1981) Influence of blue-green algae (cyanobacteria) on survival of *Legionella pneumophila* in aerosols. *Infection and Immunity* **32** (2): 690-692.
- Berendt R.F., Young H.W., Allen R.G. et Knutsen G.L.** (1980) Dose-response of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*. *Journal of Infectious Diseases* **141** (2): 186-192.
- Berk S.G., Gunderson J.H., Newsome A.L., Farone A.L., Hayes B.J., Redding K.S., et al.** (2006) Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environmental Science and Technology* **40** (23): 7440-7444.
- 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** (1): 279-286.
- Berry D., Holder D., Xi C. et Raskin L.** (2010) Comparative transcriptomics of the response of *Escherichia coli* to the disinfectant monochloramine and to growth conditions inducing monochloramine resistance. *Water Research* **44** (17): 4924-4931.
- Berry D., Horn M., Xi C. et Raskin L.** (2010) *Mycobacterium avium* infections of *Acanthamoeba* strains: host strain variability, grazing-acquired infections, and altered dynamics of inactivation with monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (19): 6685-6688.
- Berry D., Xi C. et Raskin L.** (2006) Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current Opinion in Biotechnology* **17** (3): 297-302.
- Bichai F., Payment P. et Barbeau B.** (2008) Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **54** (7): 509-524.
- Biswas K., Craik S., Smith D.W. et Belosevic M.** (2005) Synergistic inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone followed by monochloramine in two natural waters. *Water Research* **39** (14): 3167-3176.
- Black & Veatch C.** (2010) *White's handbook of chlorination and alternative disinfectants - 5th edition*. New Jersey: **John Wiley & Sons, Inc.**
- Blanc D.S., Carrara P., Zanetti G. et Francioli P.** (2005) Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control *Legionella*: seven years of experience in a university teaching hospital. *Journal of Hospital Infection* **60** (1): 69-72.
- Bockelmann U., Manz W., Neu T.R. et Szewzyk U.** (2000) Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiology Ecology* **33** (2): 157-170.
- Bohach G.A. et Snyder I.S.** (1983a) Characterization of surfaces involved in adherence of *Legionella pneumophila* to *Fischerella* species. *Infection and Immunity* **42** (1): 318-325.

- Bohach G.A. et Snyder I.S.** (1983b) Cyanobacterial stimulation of growth and oxygen uptake by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **46** (2): 528-531.
- Bohannon B.J.M. et Hughes J.** (2003) New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Current Opinion in Microbiology* **6** (3): 282-287.
- Bollin G.E., Plouffe J.F., Para M.F. et Hackman B.** (1985) Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Applied and Environmental Microbiology* **50** (5): 1128-1131.
- Bonnell J.A. et Rippon J.E.** (1985) *Legionella* in power station cooling waters. *The Lancet* **2** (8450): 327-328.
- Borella P., Guerrieri E., Marchesi I., Bondi M., Messi P. et El-Gewely M.R.** (2005) Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. In *Biotechnology Annual Review: Elsevier*, pp. 355-380.
- Borella P., Montagna M.T., Romano-Spica V., Stampi S., Stancanelli G., Triassi M., et al.** (2004) *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerging Infectious Diseases* **10** (3): 457-464.
- Bouyer S., Imbert C., Rodier M.H. et Héchard Y.** (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environmental Microbiology* **9** (5): 1341-1344.
- 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** (2): 668-673.
- Brenner D.J., Steigerwalt A.G., Epple P., Bibb W.F., McKinney R.M., Starnes R.W., et al.** (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. *pascallei* subsp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* **26** (9): 1695-1703.
- Brenner D.J., Steigerwalt A.G. et McDade J.E.** (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Annals of Internal Medicine* **90** (4): 656-658.
- Brown M.R., Collier P.J. et Gilbert P.** (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34** (9): 1623-1628.
- Brown M.R.W.** (1975) The role of the cell envelope in resistance. In *Resistance in Pseudomonas aeruginosa* sons, J.W. (ed). Chichester, England, pp. 71-99.
- Brown M.R.W. et Barker J.** (1999) Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends in Microbiology* **7** (1): 46-50.
- Brüggemann H., Hagman A., Jules M., Sismeiro O., Dillies M.A., Gouyette C., et al.** (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology* **8** (8): 1228-1240.
- Bruinsma G.M., Rustema-Abbing M., van der Mei H.C., Lakkis C. et Busscher H.J.** (2006) Resistance to a polyquaternium-1 lens care solution and isoelectric points of *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**: 764-766.
- Burman L.G., Nordström K, Bloom GD.** (1972) Murein and the outer penetration barrier of *Escherichia coli* K-12, *Proteus mirabilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **112** (3): 1364-1374.
- Burnham K.P. et Overton W.S.** (1979) Robust estimation of population size when capture probabilities vary among animals. *Ecology* **60** (5): 927-936.
- Buse H.Y. et Ashbolt N.J.** (2011) Differential growth of *Legionella pneumophila* strains within a range of amoebae at various temperatures associated with in-premise plumbing. *Letters in Applied Microbiology* **53** (2): 217-224.
- Buse H.Y., Schoen M.E. et Ashbolt N.J.** (2012) *Legionellae* in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. *Water Research* **46** (4): 921-933.
- Byrne B. et Swanson M.S.** (1998) Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infection and Immunity* **66** (7): 3029-3034.

C

- Cabiscol E., Tamarit J. et Ros J.** (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* **3** (1): 3-8.
- Calvo-Bado L.A., Morgan J.A.W., Sergeant M., Pettitt T.R. et Whipps J.M.** (2003) Molecular characterization of *Legionella* populations present within slow sand filters used for fungal plant pathogen suppression in horticultural crops. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (1): 533-541.
- Campese C., Bitar D., Jarraud S., Maine C., Forey F.o., Etienne J., et al.** (2011a) Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France, 1998 - 2008. *International Journal of Infectious Diseases* **15** (1): e30-e37.
- Campese C., Jarraud S., Maine C. et Che D.** (2011b) Legionnaires' disease in France: increase of the number of cases in 2010. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **29-30**: 325-327.
- Campese C., Maine C. et Che D.** (2010) Les cas de légionellose déclarés en France en 2009. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **31-32**: 334-335.
- Carducci A., Verani M. et Battistini R.** (2010) *Legionella* in industrial cooling towers: monitoring and control strategies. *Letters in Applied Microbiology* **50** (1): 24-29.
- Carrington G.O.** (1979) Legionnaire's disease bacillus: inhibition by normal flora. *Clinical Microbiology Newsletter* **1** (12): 7-8.
- Carvalho F.R., Nastasi F.R., Gamba R.C., Foronda A.S. et Pellizari V.H.** (2006) Diversity of *Legionella* spp. in Antarctic lakes on the Keller Peninsula. In *Legionella: State of the art 30 years after its recognition: ASM Press*, pp. 417-419.
- Carvalho F.R., Nastasi F.R., Gamba R.C., Foronda A.S. et Pellizari V.H.** (2008) Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Current Microbiology* **57** (4): 294-300.
- Carvalho F.R., Vazoller R.F., Foronda A.S. et Pellizari V.H.** (2007) Phylogenetic study of *Legionella* species in pristine and polluted aquatic samples from a tropical Atlantic forest ecosystem. *Current Microbiology* **55** (4): 288-293.
- Casini B., Valentini P., Baggiani A., Torracca F., Frateschi S., Nelli L.C. et Privitera G.** (2008a) Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates following long-term chlorine dioxide treatment in a university hospital water system. *Journal of Hospital Infection* **69** (2): 141-147.
- Casini B., Valentini P., Baggiani A., Torracca F., Lorenzini C., Frateschi S., et al.** (2008b) Comparison of two molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* 1 strains isolated from a hospital water supply. *Water Science and Technology* **58** (3): 683-688.
- Chang C.W., Hwang YH, Cheng WY, Chang CP.** (2007) Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *Journal of Applied Microbiology* **102** (6): 1636-1644.
- Chang C.W., Kao C.H. et Liu Y.F.** (2009) Heterogeneity in chlorine susceptibility for *Legionella pneumophila* released from

- Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Journal of Applied Microbiology* **106** (1): 97-105.
- Chao A. (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11** (6): 265-270.
- Chao A. (1987) Estimating the population-size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* **43** (4): Dec 1987.
- Chao A. (2005) Species richness estimation.
- Chao A. et Lee S.M. (1992) Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association* **87** (417): 210-217.
- Chapman J.S. (2003) Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration and Biodegradation* **51** (2): 133-138.
- Che D., Campèse C. et Jarraud S. (2009) Légionelles et légionellose : qu'a-t-on découvert depuis 30 ans ? *Pathologie Biologie* **59** (3): 134-136.
- Chen S., Hicks L., Yuen M., Mitchell D. et Gilbert G.L. (1994) Serological cross-reaction between *Legionella* spp. and *Capnocytophaga ochracea* by using latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology* **32** (12): 3054-3055.
- Chiari A., Bonura C., Ferraro D., Barbaro R., Cala C., Distefano S., et al. (2008) Genotyping of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated in Northern Sicily, Italy. *New Microbiology* **31** (2): 217-228.
- Chick H. (1908) An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene* **8**: 92.
- Cho M., Kim J., Kim J.Y., Yoon J. et Kim J.H. (2010) Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research* **44** (11): 3410-3418.
- Cianciotto N.P. (2001) Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* **291** (5): 331-343.
- Ciccarelli F.D., Doerks T., von Mering C., Creevey C.J., Snel B. et Bork P. (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311** (5765): 1283-1287.
- Ciesielski C.A., Blaser M.J. et Wang W.L. (1986) Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infection and Immunity* **51** (2): 397-404.
- Codony F., Morato J. et Mas J. (2005) Role of discontinuous chlorination on microbial production by drinking water biofilms. *Water Research* **39** (9): 1896-1906.
- Cogan N.G. et Keener J.P. (2004) The role of the biofilm matrix in structural development. *Mathematical Medicine and Biology* **21** (2): 147-166.
- Collins M.D. et Gilbert J. (1983) New members of the Coenzyme Q series from the *Legionellaceae*. *FEMS Microbiology Letters* **16** (2-3): 251-255.
- Colwell R.K. et Coddington J.A. (1994) Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **345** (1311): 101-118.
- Colwell R.K., Xuan Mao C. et Chang J. (2004) Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* **85** (10): 2717-2727.
- Cooper I.R. et Hanlon G.W. (2010) Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *Journal of Hospital Infection* **74** (2): 152-159.
- Cooper I.R., White J., Mahenthiralingam E. et Hanlon G.W. (2008) Long-term persistence of a single *Legionella pneumophila* strain possessing the mip gene in a municipal shower despite repeated cycles of chlorination. *Journal of Hospital Infection* **70** (2): 154-159.
- Cordevant C., Tang J.S., Cleland D. et Lange M. (2003) Characterization of members of the *Legionellaceae* family by automated ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* **41** (1): 34-43.
- Corona-Vasquez B., Samuelson A., Rennecker J.L. et Mariñas B.J. (2002) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. *Water Research* **36** (16): 4053-4063.
- Coscolla M. et Gonzalez-Candelas F. (2009) Comparison of clinical and environmental samples of *Legionella pneumophila* at the nucleotide sequence level. *Infection, Genetics and Evolution* **9** (5): 882-888.
- Costa J., Tiago I., Da Costa M.S. et Verissimo A. (2005) Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (2): 663-671.
- Costa J., Tiago I., Da Costa M.S. et Verissimo A. (2010) Molecular evolution of *Legionella pneumophila* dotA gene, the contribution of natural environmental strains. *Environmental Microbiology* **12** (10): 2711-2729.
- Costello M.J. (2000) A framework for an action plan on marine biodiversity in Ireland. In. Dublin: The Marine Institute.
- Costerton J.W., Stewart P.S. et Greenberg E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284** (5418): 1318-1322.
- Crespi B.J. (2001) The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecology and Evolution* **16** (4): 178-183.
- Croteau D.L. et Bohr V.A. (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **272** (41): 25409-25412.
- Cummins C.S. (1962) Chemical composition and antigenic structure of cell walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces* and *Arthrobacter*. *Journal of General Microbiology* **28** (1): 35-50.
- Cunliffe D.A. (1990) Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine. *Journal of Applied Microbiology* **68** (5): 453-459.
- Curtis T.P., Head I.M., Lunn M., Woodcock S., Schloss P.D. et Sloan W.T. (2006) What is the extent of prokaryotic diversity? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361** (1475): 2023-2037.
- Curtis T.P., Sloan W.T. et Scannell J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99** (16): 10494-10499.

D

- Danger M., Leflaive J., Oumarou C., Ten-Hage L. et Lacroix G. (2007) Control of phytoplankton-bacteria interactions by stoichiometric constraints. *Oikos* **116** (7): 1079-1086.
- De Zoysa A.S. et Harrison T.G. (1999) Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by pulsed-field gel electrophoresis with SfiI and comparison of this method with restriction fragment-length polymorphism analysis. *Journal of Medical Microbiology* **48** (3): 269-278.
- Declerck P. (2010) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology* **12** (3): 557-566.
- Declerck P., Behets J., De Keersmaecker B. et Ollevier F. (2007a) Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Journal of Applied Microbiology* **103** (6): 2697-2703.
- Declerck P., Behets J., Delaet Y., Margineanu A., Lammertyn E. et Ollevier F. (2005) Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in

- Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microbial Ecology* **50** (4): 536-549.
- Declerck P., Behets J., Margineanu A., van Hoef V., De Keersmaecker B. et Ollevier F.** (2009) Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiological Research* **164** (6): 593-603.
- Declerck P., Behets J., van Hoef V. et Ollevier F.** (2007b) Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research* **41** (14): 3159-3167.
- Den Boer J.W., Bruin J.P., Verhoef L.P., Van der Zwaluw K., Jansen R. et Yzerman E.P.** (2008) Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006. *Clinical Microbiology and Infection* **14** (5): 459-466.
- Den Boer J.W., Yzerman E.P.F., Jansen R., Bruin J.P., Verhoef L.P.B., Neve G. et Van der Zwaluw K.** (2007) Legionnaires' disease and gardening. *Clinical Microbiology and Infection* **13** (1): 88-91.
- Dennis P.J., Green D. et Jones B.P.C.** (1984) A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *Journal of Applied Microbiology* **56** (2): 349-350.
- Denyer S.P.** (1995) Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation* **36** (3-4): 227-245.
- Denyer S.P., Maillard, J.Y.** (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **31** (S): 35S-45S.
- Deubner D.C., MacCormack J.N., Kleeman K. et Muhlbaier L.H.** (1986) One-time screening to define the problem: *Legionella* exposure in an electric power company. *Journal of Occupational Medicine* **28** (8): 670-673.
- Devos L., Boon N. et Verstraete W.** (2005) *Legionella pneumophila* in the environment: the occurrence of a fastidious bacterium in oligotrophic conditions. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **4** (1): 61-74.
- Dey R., Bodennec J., Mameri M.O. et Pernin P.** (2009) Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters* **290** (1): 10-17.
- Diederien B.M.W.** (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection* **56** (1): 1-12.
- Diederien B.M.W., de Jong C.M.A., Aarts I., F. P.M. et van der Zee A.** (2007) Molecular evidence for the ubiquitous presence of *Legionella* species in Dutch tap water installations. *Journal of Water and Health* **5** (3): 375-383.
- 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** (7): 2248-2254.
- Ditommaso S., Giacomuzzi M., Gentile M. et Zotti C.M.** (2008) Antibody detection and cross-reactivity among species and serogroups of *Legionella* by indirect immunofluorescence test. *Journal of Microbiological Methods* **75** (2): 350-353.
- Doleans A., Aurell H., Reyrolle M., Lina G., Freney J., Vandenesch F., et al.** (2004) Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *Journal of Clinical Microbiology* **42** (1): 458-460.
- Dominguez A.P.M., Bizani D., Cladera-Olivera F. et Brandelli A.** (2007) Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* **35** (2): 238-243.
- Domka J., Lee J., Bansal T. et Wood T.K.** (2007) Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environmental Microbiology* **9** (2): 332-346.
- Donlan R.M.** (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8** (9): 881-890.
- Donlan R.M. et Costerton J.W.** (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15** (2): 167-193.
- Donlan R.M., Forster T M.R., Brown E L.C., Carpenter J et B F.** (2005) *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling* **21** (1): 1-7.
- Dorigo U., Volatier L. et Humbert J.F.** (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* **39** (11): 2207-2218.
- Dorsey C.W. et Actis L.A.** (2004) Analysis of pVU3695, a plasmid encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity and formaldehyde resistance in the *Escherichia coli* VU3695 clinical strain. *Plasmid* **51** (2): 116-126.
- Doyle M.P., Busta F., Cords B.R., Davidson M., Hawke J., Hurd S., et al.** (2006) Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5** (3): 71-137.
- 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** (4): 628-632.
- Driedger A.M., Rennecker J.L. et Marinas B.J.** (2001) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and monochloramine at low temperature. *Water Research* **35** (1): 41-48.
- Dukan S. et Touati D.** (1996) Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *Journal of Bacteriology* **178** (21): 6145-6150.
- Dunbar J., Barns S.M., Ticknor L.O. et Kuske C.R.** (2002) Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (6): 3035-3045.
- Dupuy M., Mazoua S., Berne F., Bodet C., Garrec N., Herbelin P., et al.** (2011) Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Research* **45** (3): 1087-1094.
- Dusserre E., Ginevra C., Hallier-Soulier S., Vandenesch F., Festoc G., Etienne J., et al.** (2008) A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *legionellae* that can recover their cultivability. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (15): 4817-4824.
- Dutil S., Tessier S., Veillette M., Laflamme C., Mériaux A., Leduc A., et al.** (2006) Detection of *Legionella* spp. by fluorescent in situ hybridization in dental unit waterlines. *Journal of Applied Microbiology* **100** (5): 955-963.

E

- Eagle H. et Musselman A.D.** (1948) The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *The Journal of Experimental Medicine* **88** (1): 99-131.
- Edelstein P.H. et Cianciotto N.P.** (2006) *Legionella* species and Legionnaires' disease. In *The prokaryotes 3rd edition: A handbook on the biology of bacteria*. Dworkin, M. (ed): Springer, pp. 988-1033.

- Edwards M.T., Fry N.K. et Harrison T.G. (2008) Clonal population structure of *Legionella pneumophila* inferred from allelic profiling. *Microbiology* **154** (Pt 3): 852-864.
- Eichler S., Christen R., Hölzle C., Westphal P., Bötzel J., Brettar I., et al. (2006) Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (3): 1858-1872.
- Elser J. (2006) Biological stoichiometry: a chemical bridge between ecosystem ecology and evolutionary biology. *The American Naturalist* **168** (S6): S25-S35.
- Elser J.J., Acharya K., Kyle M., Cotner J., Makino W., Markow T., et al. (2003) Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecology Letters* **6** (10): 936-943.
- Elser J.J., Dobberfuhl D.R., MacKay N.A. et Schampel J.H. (1996) Organism size, life history, and N:P stoichiometry. *BioScience* **46** (9): 674-684.
- Elser J.J., Sterner R.W., Gorokhova E., Fagan W.F., Markow T.A., Cotner J.B., et al. (2000) Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters* **3** (6): 540-550.
- Elser J.J. et Urabe J. (1999) The stoichiometry of consumer-driven nutrient recycling: theory, observations and consequences. *Ecology* **80** (3): 735-751.
- Elvers K.T., Leeming K. et Lappin-Scott H.M. (2002) Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29** (6): 331-338.
- Emtiazi F., Schwartz T., Marten S.M., Krolla-Sidenstein P. et Obst U. (2004) Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Research* **38** (5): 1197-1206.
- ESCMID E.o.t. (2000) Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection* **6** (9): 503-508.
- Evans M.D., Dizdaroğlu M. et Cooke M.S. (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **567** (1): 1-61.
- ## F
- Faulkner G. et Garduno R.A. (2002) Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* **184** (24): 7025-7041.
- Favier A. (2003) Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* novembre-décembre: 108-115.
- Feeley J.C., Gorman G.W., Weaver R.E., Mackel D.C. et Smith H.W. (1978) Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *Journal of Clinical Microbiology* **8** (3): 320-325.
- Fernandez J., Lopez P., Orozco D. et Merino J. (2002) Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, southeastern Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21** (10): 729-735.
- Fernando W.J.N. (2009) Theoretical considerations and modeling of chemical inactivation of microorganisms: Inactivation of *Giardia* Cysts by free chlorine. *Journal of Theoretical Biology* **259** (2): 297-303.
- 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** (5): 353-360.
- Fields B. (1992) *Procedures for the recovery of Legionella from the environment*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services.
- Fields B.S. (1993) *Legionella* and protozoa: interaction of a pathogen and its natural host. In *Legionella: Current status and emerging perspectives*. Press, A. (ed), pp. 129-136.
- Fields B.S. (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends in Microbiology* **4** (7): 286-290.
- Fields B.S., Barbaree J.M., Sanden G.N. et Morrill W.E. (1990a) Virulence of a *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. *Infection and Immunity* **58** (9): 3139-3142.
- Fields B.S., Benson R.F. et Besser R.E. (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* **15** (3): 506-526.
- Fields B.S., Nerad T.A., Sawyer T.K., King C.H., Barbaree J.M., Martin W.T., et al. (1990b) Characterization of an axenic strain of *Hartmannella vermiformis* obtained from an investigation of nosocomial Legionellosis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **37** (6): 581-583.
- Fields B.S., Shotts E.B., 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** (3): 467-471.
- Fisher R.A., Corbet S. et Williams C.B. (1943) The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *Journal of Animal Ecology* **12** (1): 42-58.
- Flannery B., Gelling L.B., Vugia D.J., Weintraub J.M., Salerno J.J., Conroy M.J., et al. (2006) Reducing *Legionella* colonization of water systems with monochloramine. *Emerging Infectious Diseases* **12** (4).
- Flemming H.C., Percival S.L. et Walker J.T. (2002) Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Supply* **2** (1): 271-280.
- Flesher A.R., Kasper D.L., Modern P.A. et Mason E.O. (1980) *Legionella pneumophila*: growth inhibition by human pharyngeal flora. *Journal of Infectious Diseases* **142** (3): 313-317.
- Fliermans C.B. (1996) Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with a little wisdom. *Microbial Ecology* **32** (2): 203-228.
- Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J., Tison D.L. et Pope D.H. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **41** (1): 9-16.
- Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H. et Thacker L. (1979) Isolation of *Legionella pneumophila* from nonepidemic-related aquatic habitats. *Applied and Environmental Microbiology* **37** (6): 1239-1242.
- Foggo A., Attrill M.J., Frost M.T. et Rowden A.A. (2003) Estimating marine species richness: an evaluation of six extrapolative techniques. *Marine Ecology Progress Series* **248**: 15-26.
- Foster P.L. (2005) Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **569** (1-2): 3-11.
- Foster P.L. (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *National Institutes of Health* **42** (5): 373-397.
- Fox G.E., Wisotzkey J.D. et Jurtshuk P. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42** (1): 166-170.
- Franklin R.B., Taylor D.R. et Mills A.L. (1999) Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods* **35** (3): 225-235.

- Fraser D.W., Tsai T.R., Orenstein W., Parkin W.E., Beecham H.J., Sharrar R.G., et al. (1977) Legionnaires' disease - description of an epidemic of pneumonia. *New England Journal of Medicine* **297** (22): 1189-1197.
- Fraud S., Hann A.C., Maillard J.Y. et Russell A.D. (2003) Effects of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and chlorhexidine diacetate on *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* strains with modified permeability. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51** (3): 575-584.
- Fredrickson A.G. (1977) Behavior of mixed cultures of microorganisms. *Annual Review of Microbiology* **31** (1): 63-88.
- Fry N., Bangsberg J., Bergmans A., Bernander S., Etienne J., Franzin L., et al. (2002) Designation of the European working group on *Legionella* infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21** (10): 722-728.
- Fry N.K., Alexiou-Daniel S., Bangsberg J.M., Bernander S., Pastoris M.C., Etienne J., et al. (1999) A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. *Clinical Microbiology and Infection* **5** (8): 462-477.
- Fry N.K., Bangsberg J.M., Bernander S., Etienne J., Forsblom B., Gaia V., et al. (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** (10): 773-780.
- 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** (8): 667-678.
- Fry N.K., Warwick S., Saunders N.A. et Embley T.M. (1991) The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *Journal of General Microbiology* **137** (5): 1215-1222.
- Fuhrman J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399** (6736): 541-548.
- Fujinami Y., Kikkawa H.S., Kurosaki Y., Sakurada K., Yoshino M. et Yasuda J. (2011) Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiological Research* **166** (2): 77-86.
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S. et Stoodley P. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* **13** (1): 34-40.
- G**
- Gagnon G.A., Rand J.L., O' Leary K.C., Rygel A.C., Chauret C. et Andrews R.C. (2005) Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water Research* **39** (9): 1809-1817.
- Gaia V., Casati S. et Tonolla M. (2011) Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology* **34** (1): 40-44.
- Gaia V., Fry N.K., Afshar B., Luck P.C., Meugnier H., Etienne J., et al. (2005) Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (5): 2047-2052.
- Gaia V., Fry N.K., Harrison T.G. et Peduzzi R. (2003) Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *Journal of Clinical Microbiology* **41** (7): 2932-2939.
- Gao L.Y., Susa M., Ticac B. et Kwaik Y.A. (1999) Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells. *Microbial Pathogenesis* **27** (5): 273-287.
- 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** (11): 4738-4746.
- Garcia-Nunez M., Ferrer J., Ragull S., Junyent E., Sagrista E., Soler A., et al. (2006) Persistence and genotypic stability of *Legionella* in a potable-water system in a hotel over a 20-month period. In *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. Cianciotto, N.P., Abu Kwaik, Y., Edelstein, P.H., Fields, B.S., Geary, D.F., Harrison, T.G., et al. (eds). Washington DC: ASM Press.
- Garcia M.T., Baladron B., Gil V., Tarancon M.L., Vilasau A., Ibanez A., et al. (2008) Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *Journal of Applied Microbiology* **105** (3): 837-847.
- Garcia M.T., Jones S., Pelaz C., Millar R.D. et Abu Kwaik Y. (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology* **9** (5): 1267-1277.
- Garduno R.A. (2007) Life cycle, growth cycles and developmental cycle of *Legionella pneumophila*. In *Legionella pneumophila*, pp. 65-84.
- 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** (11): 6273-6283.
- Garrity G. (2005) *The probacteria - Part B*. New York: Springer.
- Garrity G.M., Bell J.A. et Lilburn T. (2005) *Legionellales* ord. nov. In *Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition*. Brenner, D.J., Krieg, N.R. et Staley, J.T. (eds). New York: Springer, pp. 210-237.
- Gaudy A.F. et Gaudy E.T. (1980) *Microbiology for environmental scientists and engineers*. McGraw-Hill.
- George J.R., Pine L., Reeves M.W. et Harrell W.K. (1980) Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* **11** (3): 286-291.
- Gilbart J. et Collins M.D. (1985) High-performance liquid chromatographic analysis of ubiquinones from new *Legionella* species. *FEMS Microbiology Letters* **26** (1): 77-82.
- Gilbride K.A., Lee D.Y. et Beaudette L.A. (2006) Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods* **66** (1): 1-20.
- Gilmour M.W., Bernard K., Tracz D.M., Olson A.B., Corbett C.R., Burdz T., et al. (2007) Molecular typing of a *Legionella pneumophila* outbreak in Ontario, Canada. *Journal of Medical Microbiology* **56**: 336-341.
- Glick T.H., Gregg M.B., Berman B., Mallison G., Rhodes W.W. et Kassanoff I. (1978) Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology* **107** (2): 149-160.
- Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F. et Moletta R. (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (7): 2802-2813.
- Gomez-Lus R., Lomba E., Gomez-Lus P., Abarca M.S., Gomez-Lus S., Martinez A., et al. (1993) In vitro antagonistic activity of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Aeromonas* spp. against *Legionella* spp. In *Legionella: Current status and*

emerging perspectives. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. et Dufour, A.P. (eds). Washington DC: ASM Press.

Gomez-Valero L., Rusniok C. et Buchrieser C. (2009) *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. *Infection, Genetics and Evolution* **9** (5): 727-739.

Good I.J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40** (3-4): 237-264.

Goslan E.H., Krasner S.W., Bower M., Rocks S.A., Holmes P., Levy L.S. et Parsons S.A. (2009) A comparison of disinfection by-products found in chlorinated and chloraminated drinking waters in Scotland. *Water Research* **43** (18): 4698-4706.

Gotelli N.J. et Colwell R.K. (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* **4**: 379-391.

Gottardi W. et Nagl M. (2005) Chlorine covers on living bacteria: the initial step in antimicrobial action of active chlorine compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55** (4): 475-482.

Grattard F., Ginevra C., Riffard S., Ros A., Jarraud S., Etienne J. et Pozzetto B. (2006) Analysis of the genetic diversity of *Legionella* by sequencing the 23S-5S ribosomal intergenic spacer region: from phylogeny to direct identification of isolates at the species level from clinical specimens. *Microbes and Infection* **8** (1): 73-83.

Gray J.S., Clarke K.R., Warwick R.M. et Hobbs G. (1990) Detection of initial effects of pollution on marine benthos: an example from the Ekofisk and Eldfisk oilfields, North Sea. *Marine Ecology Progress Series* **66**: 285-299.

Green P.N. et Pirrie R.S. (1993) A laboratory apparatus for the generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms. *Journal of Applied Bacteriology* **74** (4): 388-393.

Greer C.W., Whyte L.G., Lawrence J.R., Masson L. et Brousseau R. (2001) Peer reviewed: genomics technologies for environmental science. *Environmental Science and Technology* **35** (17): 364A-370A.

Greub G. et Raoult D. (2003) Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmannella vermiformis*. *Research in Microbiology* **154** (9): 619-621.

Griffiths B., Díaz-Raviña M., Ritz K., McNicol J., Ebbelwhite N. et Bååth E. (1997) Community DNA hybridisation and %G+C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. *FEMS Microbiology Ecology* **24** (2): 103-112.

Grimm D., Merkert H., Ludwig W., Schleifer K.H., Hacker J.r. et Brand B.C. (1998) Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (7): 2686-2690.

Gueriri I., Bay Dubrac S., Cyncynatus C. et Msadek T. (2008) The Pta-AckA pathway controlling acetyl phosphate levels and the phosphorylation state of the DegU orphan response regulator both play a role in regulating *Listeria monocytogenes* motility and chemotaxis. *Molecular Microbiology* **70**: 1342 - 1357.

Guerrieri E., Bondi M., Borella P. et Messi P. (2007) Influence of aquatic microorganisms on *Legionella pneumophila* survival. *New Microbiologica* **30** (3): 247-251.

Guerrieri E., Bondi M., Sabia C., de Niederhausern S., Borella P. et Messi P. (2008) Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Current Microbiology* **57** (6): 532-536.

Gutell R.R., Larsen N. et Woese C.R. (1994) Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological Reviews* **58** (1): 10-26.

Gyurek L.L. et Finch G.R. (1998) Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *Journal of Environmental Engineering* **124** (9): 783.

H

Haas C.N. et Karra S.B. (1984) Kinetics of microbial inactivation by chlorine - I Review of results in demand-free systems. *Water Research* **18** (11): 1443-1449.

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** (2): 165-171.

Hahn M.W. et Höfle M.G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **35** (2): 113-121.

Hall-Stoodley L., Costerton J.W. et Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2** (2): 95-108.

Halliwell B. (2006) Update on reactive species and antioxidants: reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**: 312-322.

Hammer B.K. et Swanson M.S. (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Molecular Microbiology* **33** (4): 721-731.

Hammer O., Harper D.A.T. et Ryan P.D. (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4** (1): 4-9.

Handley S.A. et Regnery R.L. (2000) Differentiation of pathogenic *Bartonella* species by infrequent restriction site PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **38** (8): 3010-3015.

Hannum D.M., Barrette W.C. et Hurst J.K. (1995) Subunit sites of oxidative inactivation of *Escherichia coli* F1-ATPase by HOCl. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212** (3): 868-874.

Harb O.S., Gao L.Y. et Kwaik Y.A. (2000) From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environmental Microbiology* **2** (3): 251-265.

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** (1): 126-132.

Harf C. et Monteil H. (1988) Interactions between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. *Water Science and Technology* **20** (11-12): 235.

Harrison J.J., Ceri H. et Turner R.J. (2007a) Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology* **5** (12): 928-938.

Harrison T.G., Doshi N., Fry N.K. et Joseph C.A. (2007b) Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. *Clinical Microbiology and Infection* **13** (1): 78-85.

Hartmann M. et Widmer F. (2006) Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (12): 7804-7812.

Haruta S., Kato S., Yamamoto K. et Igarashi Y. (2009) Intertwined interspecies relationships: approaches to untangle the microbial network. *Environmental Microbiology* **11** (12): 2963-2969.

Hawkins C.L. et Davies M.J. (2002) Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chemical Research in Toxicology* **15** (1): 83-92.

- He F. et Tang D. (2008) Estimating the niche preemption parameter of the geometric series. *Acta Oecologica* **33** (1): 105-107.
- Head I.M., Saunders J.R. et Pickup R.W. (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* **35** (1): 1-21.
- Heath R.J. et Rock C.O. (2000) A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature* **406** (6792): 145-146.
- Hebert G.A. (1981) Hippurate hydrolysis by *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* **13** (1): 240-242.
- Hécharde Y., Ferraz S., Bruneteau E., Steinert M. et Berjeaud J.M. (2005) Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide. *FEMS Microbiology Letters* **252** (1): 19-23.
- Heck K.L., van Belle G. et Simberloff D. (1975) Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* **56** (6): 1459-1461.
- Heim S., Del Mar Lleo M., Bonato B., Guzman C.A. et Canepari P. (2002) The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *Journal of Bacteriology* **184** (23): 6739-6745.
- Helbig J.H., Bernander S.B., Castellani Pastoris M.C.P., Etienne J.E., Gaia V.G., Lauwers S.L., et al. (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** (10): 710-716.
- Helbig J.H., Kurtz J.B., Pastoris M.C., Pelaz C. et Lück P.C. (1997) Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *Journal of Clinical Microbiology* **35** (11): 2841-2845.
- Helbig J.H., Lück P.C. et Witzleb W. (1994) Serogroup-specific and serogroup-cross-reactive epitopes of *Legionella pneumophila*. *Zentralblatt für Bakteriologie* **281** (1): 16-23.
- Helbling D.E. et VanBriesen J.M. (2007) Free chlorine demand and cell survival of microbial suspensions. *Water Research* **41** (19): 4424-4434.
- Heller R., Holler C., Sussmuth R. et Gundermann K.O. (1998) Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Letters in Applied Microbiology* **26** (1): 64-68.
- Henke M. et Seidel K.M. (1986) Association between *Legionella pneumophila* and amoebae in water. *Israel Journal of Medical Sciences* **22** (9): 690-695.
- Herndl G.J., Agogué H., Baltar F., Reinthaler T., Sintes E. et Varela M.M. (2008) Regulation of aquatic microbial processes: the "microbial loop" of the sunlit surface waters and the dark ocean dissected. *Aquatic Microbial Ecology* **53** (1): 59-68.
- Hery M., Herrera A., Vogel T.M., Normand P. et Navarro E. (2005) Effect of carbon and nitrogen input on the bacterial community structure of Neocaledonian nickel mine spoils. *FEMS Microbiology Ecology* **51** (3): 333-340.
- 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** (1): 69-77.
- 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** (1): 133-143.
- Hilbi H., Weber S.S., Ragaz C., Nyfeler Y. et Urwyler S. (2007) Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environmental Microbiology* **9** (3): 563-575.
- Hindre T., Bruggemann H., Buchrieser C. et Hechard Y. (2008) Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* **154** (Pt 1): 30-41.
- 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** (1): 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** (9): 2377-2381.
- Hookey J.V., Saunders N.A., Fry N.K., Birtles R.J. et Harrison T.G. (1996) Phylogeny of Legionellaceae based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46** (2): 526-531.
- Horwitz M.A. (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* **158** (6): 2108-2126.
- Horwitz M.A. et Maxfield F.R. (1984) *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *The Journal of Cell Biology* **99** (6): 1936-1943.
- Horwitz M.A. et Silverstein S.C. (1980) Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *The Journal of Clinical Investigation* **66** (3): 441-450.
- Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H. et Bohannon B.J.M. (2001) Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (10): 4399-4406.
- Hughes K.A., Sutherland I.W. et Jones M.V. (1998) Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* **144** (11): 3039-3047.
- Hunter P.R. et Gaston M.A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **26** (11): 2465-2466.
- Hurlbert S.H. (1971) The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52** (4): 577-586.
-
- I
-
- Ingols R.S. (1958) The effect of monochloramine and chromate on bacterial chromosomes. *Public Health Works* **89**: 105-106.
- Institute C.a.L.S. (1999) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. *NCCLS* **19** (18).
- Ishak H., Plowes R., Sen R., Kellner K., Meyer E., Estrada D., et al. (2011) Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* ant colonies characterized by 16S amplicon 454 pyrosequencing. *Microbial Ecology* **61** (4): 821-831.
-
- J
-
- Jacangelo J.G., Olivieri V.P. et Kawata K. (1987) Mechanism of inactivation of microorganisms by combined chlorine. **American Water Works Association**.
- Jacangelo J.G., Olivieri V.P. et Kawata K. (1991) Investigating the mechanism of inactivation of *Escherichia coli* B by monochloramine. *Journal American Water Works Association* **83** (5): 80-87.
- 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** (11): 4224-4230.

Jansa J., Caylà J., Ferrer D., Gracia J., Pelaz C., Salvador M., et al. (2002) An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: importance of the first 24 hours in the investigation. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **6** (9): 831-838.

Jantzen E., Sonesson A., Tangen T. et Eng J. (1993) Hydroxy-fatty acid profiles of *Legionella* species: diagnostic usefulness assessed by principal component analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **31** (6): 1413-1419.

Jarlier V. et Nikaido H. (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *Journal of Bacteriology* **172** (3): 1418-1423.

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*. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. et Dufour, A.P. (eds). Washington, D.C: American Society for Microbiology, pp. 151-153.

Jenkinson D.S. (1989) The Rothamsted long-term experiments: are they still of use? *Agronomy Journal* **83** (1): 2-10.

Joly J.R., McKinney R.M., Tobin J.O., Bibb W.F., Watkins I.D. et Ramsay D. (1986) Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* **23** (4): 768-771.

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** (6): 2284-2291.

Joseph C., Morgan D., Birtles R., Pelaz C., Martín-Bourgón C., Black M., et al. (1996) An international investigation of an outbreak of legionnaires disease among UK and French tourists. *European Journal of Epidemiology* **12** (3): 215-219.

Joseph C.A., Watson J.M., Harrison T.G. et Bartlett C.L. (1994) Nosocomial Legionnaires' disease in England and Wales, 1980-92. *Epidemiology and Infection* **112** (2): 329-345.

Jules M. et Buchrieser C. (2007) *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Letters* **581** (15): 2829-2838.

Jurgens D. et Fehrenbach F.J. (1995) Cross-reacting lipopolysaccharide antigens in *Legionella pneumophila* serogroups 1 to 14. *Infection and Immunity* **63** (6): 2180-2184.

Jurgens K. et Matz C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81** (1): 413-434.

K

Kahlisch L., Henne K., Draheim J., Brettar I. et Höfle M.G. (2010) High-resolution in situ genotyping of *Legionella pneumophila* populations in drinking water by multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis using environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (18): 6186-6195.

Kan J., Hanson T.E., Ginter J.M., Wang K. et Chen F. (2005) Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. *Saline Systems* **1**: 7.

Kay A.D., Ashton I.W., Gorokhova E., Kerkhoff A.J., Liess A. et Litchman E. (2005) Toward a stoichiometric framework for evolutionary biology. *Oikos* **109** (1): 6-17.

Kemp P.F. et Aller J.Y. (2004) Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology* **47** (2): 161-177.

Kerstens K. et De Ley J. (1975) Identification and grouping of bacteria numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *Journal of General Microbiology* **87** (2): 333-342.

Kilvington S. et Price J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of Applied Bacteriology* **68** (5): 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** (18): 4433-4444.

Kim J., Hahn J.S., Franklin M.J., Stewart P.S. et Yoon J. (2009a) Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **63** (1): 129-135.

Kim J., Park H.J., Lee J.H., Hahn J.S., Gu M.B. et Yoon J. (2009b) Differential effect of chlorine on the oxidative stress generation in dormant and active cells within colony biofilm. *Water Research* **43** (20): 5252-5259.

Kim J., Pitts B., Stewart P.S., Camper A. et Yoon J. (2008) Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52** (4): 1446-1453.

Kim J.M., Kim K.H., Song E.J., Lee S.M., Lee E.Y., Park E.H. et Chang C.L. (2006) Molecular epidemiologic analysis of *Legionella pneumophila* by infrequent-restriction-site polymerase chain reaction. *Korean Journal of Clinical Microbiology* **9** (1): 24-29.

Kimiran Erdem A. et Yazici A. (2008) An *in vitro* evaluation of the interactions of *Legionella pneumophila* serogroups 2 to 14 strains with other bacteria in the same habitat. *Annals of Microbiology* **58** (3): 395-401.

King C.H., Fields B.S., Shotts E.B. et White E.H. (1991) Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells. *Infection and Immunity* **59** (3): 758-763.

King C.H., Shotts E.B., Wooley R.E. et Porter K.G. (1988) Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Applied and Environmental Microbiology* **54** (12): 3023-3033.

King D.A., Hannum D.M., Qi J.S. et Hurst J.K. (2004) HOCl-mediated cell death and metabolic dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **423** (1): 170-181.

Knudson G.B. et Mikesell P. (1980) A plasmid in *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **29** (3): 1092-1095.

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** (3): 325-337.

Kohring L.L., Ringelberg D.B., Devereux R., Stahl D.A., Mittelman M.W. et White D.C. (1994) Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **119** (3): 303-308.

Koide M., Arakaki N. et Saito A. (2001) Distribution of *Legionella longbeachae* and other legionellae in Japanese potting soils. *Journal of Infection and Chemotherapy* **7** (4): 224-227.

Koide M., Miyata T., Nukina M., Teramoto T., Nakanishi H., Kamiki T., et al. (1989) A strain of *Pseudomonas vesicularis* isolated from shower hose which supports the multiplication of *Legionella*. *Kansenshogaku Zasshi* **63** (10): 1160-1164.

Konishi T., Yamashiro T., Koide M. et Nishizono A. (2006) Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila*

biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101** (6): 478-484.

Konstantinidis K.T., Ramette A. et Tiedje J.M. (2006) The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **361** (1475): 1929-1940.

Konstantinidis K.T. et Tiedje J.M. (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102** (7): 2567-2572.

Kool J.L., Carpenter J.C. et Fields B.S. (1999a) Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *The Lancet* **353** (9149): 272-277.

Kool J.L.M.D., Bergmireâ€ Sweat D.M.P.H., Butler J.C.M.D., Brown E.W., Peabody D.J.M.D., Massi D.S.M.D., et al. (1999b) Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial Legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **20** (12): 798-805.

Kormas K., Neofitou C., Pachiadaki M. et Koufostathi E. (2010) Changes of the bacterial assemblages throughout an urban drinking water distribution system. *Environmental Monitoring and Assessment* **165** (1): 27-38.

Kreft J.U. (2004) Biofilms promote altruism. *Microbiology* **150** (8): 2751-2760.

Kuchta J.M., Navratil J.S., Shepherd M.E., Wadowsky R.M., Dowling J.M., 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** (12): 4096-4100.

Kuchta J.M., States S.J., McGlaughin J.E., Overmeyer J.H., Wadowsky R.M., McNamara A.M., et al. (1985) Enhanced chlorine resistance of tap water-adapted *Legionella pneumophila* as compared with agar medium-passaged strains. *Applied and Environmental Microbiology* **50** (1): 21-26.

Kuchta J.M., States S.J., McNamara A.M., Wadowsky R.M. et Yee R.B. (1983) Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water. *Applied and Environmental Microbiology* **46** (5): 1134-1139.

Kuiper M.W., Wullings B.A., Akkermans A.D.L., Beumer R.R. et van der Kooij D. (2004) Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (11): 6826-6833.

Kummerle N., Feucht H.H. et Kaulfers P.M. (1996) Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (10): 2276-2279.

Kuramitsu H.K., He X., Lux R., Anderson M.H. et Shi W. (2007) Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71** (4): 653-670.

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** (10): 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** (10): 1050-1055.

Kusnetsov J., Torvinen E., Perola O., Nousiainen T. et Katila M.L. (2003) Colonization of hospital water systems by *Legionellae*, *Mycobacteria* and other heterotrophic bacteria potentially hazardous to risk group patients. *APMIS* **111** (5): 546-556.

L

Lacroix G. et Danger M. (2008) Des réseaux trophiques au fonctionnement des écosystèmes lacustres : vers une intégration de l'hétérogénéité et de la complexité. *Revue des Sciences de l'Eau* **21** (2): 155-172.

Lambert M.A. et Moss C.W. (1989) Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species. *Journal of Clinical Microbiology* **27** (3): 465-473.

Lambert P.A. (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **92** (S): 46S-54S.

Lambshead P.J.D., Platt H.M. et Shaw K.M. (1983) The detection of differences among assemblages of marine benthic species based on an assessment of dominance and diversity. *Journal of Natural History* **17** (6): 859-874.

Lammertyn E., Vande Voorde J., Meyen E., Maes L., Mast J. et Anne J. (2008) Evidence for the presence of *Legionella* bacteriophages in environmental water samples. *Microbial Ecology* **56** (1): 191-197.

Langmark J., Storey M.V., Ashbolt N.J. et Stenström T.A. (2007) The effects of UV disinfection on distribution pipe biofilm growth and pathogen incidence within the greater Stockholm area, Sweden. *Water Research* **41** (15): 3327-3336.

Langmark J., Storey M.V., Ashbolt N.J. et Stenström T.A. (2005) Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (2): 706-712.

Larkin Mchugh G., Moellering R.C., Hopkins C.C. et Swartz M.N. (1975) *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin: a new threat in burn units? *The Lancet* **1** (7901): 235-240.

Larson M.A. et Marinas B.J. (2003) Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and monochloramine. *Water Research* **37** (4): 833-844.

Lasheras A., Boulestreau H., Rogues A.M., Ohayon-Courtes C., Labadie J.C. et Gachie J.P. (2006) Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *American Journal of Infection Control* **34** (8): 520-525.

Lau H.Y. et Ashbolt N.J. (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **107** (2): 368-378.

Lawrence C., Reyrolle M., Dubrou S., Forey F., Decludt B., Goulvestre C., et al. (1999a) 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** (8): 2652-2655.

Lawrence C., Ronco E., Dubrou S., Leclercq R., Nauciel C. et Matsiota-Bernard P. (1999b) 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** (4): 327-333.

Layton J.C. et Foster P.L. (2005) Error-prone DNA polymerase IV is regulated by the heat shock chaperone GroE in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187** (2): 449-457.

LeBlanc J.J., Brassinga A.K.C., Ewann F., Davidson R.J. et Hoffman P.S. (2008) An ortholog of OxyR in *Legionella pneumophila* is expressed postexponentially and negatively regulates the alkyl hydroperoxide reductase (ahpC2D) operon. *Journal of Bacteriology* **190** (10): 3444-3455.

- LeBlanc J.J., Davidson R.J. et Hoffman P.S. (2006) Compensatory functions of two alkyl hydroperoxide reductases in the oxidative defense system of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* **188** (17): 6235-6244.
- LeChevallier M.W. et Au K.K. (2004) *Water treatment and pathogen control: process efficiency in achieving safe drinking water*. London, UK: WHO
- LeChevallier M.W., Babcock T.M. et Lee R.G. (1987) Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **53** (12): 2714-2724.
- LeChevallier M.W., Cawthon C.D. et Lee R.G. (1988) Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **54** (10): 2492-2499.
- Lee J.V. et West A.A. (1991) Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *Journal of Applied Bacteriology* **70**: 121S-129S.
- Lee S. et Fuhrman J.A. (1990) DNA hybridization to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages. *Applied and Environmental Microbiology* **56** (3): 739-746.
- Lee S. et Fuhrman J.A. (1991) Spatial and temporal variation of natural bacterioplankton assemblages studied by total genomic DNA cross-hybridization. *Limnology and Oceanography* **36** (7): 1277.
- Lee W.H., Wahman D.G., Bishop P.L. et Pressman J.G. (2011) Free chlorine and monochloramine application to nitrifying biofilm: comparison of biofilm penetration, activity, and viability. *Environmental Science and Technology* **45** (4): 1412-1419.
- Lema M. et Brown A. (1983) Electrophoretic characterization of soluble protein extracts of *Legionella pneumophila* and other members of the family *Legionellaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* **17** (6): 1132-1140.
- Leoni E., De Luca G., Legnani P.P., Sacchetti R., Stampi S. et Zanetti F. (2005) *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *Journal of Applied Microbiology* **98** (2): 373-379.
- 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** (1): 27-33.
- Levi Y. (2001) Ecologie microbienne des réseaux d'eau potable et risque microbiologique : l'exemple de *Legionella pneumophila*. *Revue Française des Laboratoires* **2001** (336): 33-37.
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.P., Shacter E. et Lester P. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in Enzymology*: Academic Press, pp. 346-357.
- Li H., Hsieh M.K., Chien S.H., Monnell J.D., Dzombak D.A. et Vidic R.D. (2011) Control of mineral scale deposition in cooling systems using secondary-treated municipal wastewater. *Water Research* **45** (2): 748-760.
- Li X.Z., Nikaido H. et Poole K. (1995) Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39** (9): 1948-1953.
- Lin Y.S.E., Yu V.L., Vidic R.D. et States S.J. (2000) Discussion of monochloramine and Legionnaires' disease'. *Journal AWWA* **92** (10): 88-90.
- Lin Y.T., Jangid K., Whitman W., Coleman D. et Chiu C.Y. (2011) Change in bacterial community structure in response to disturbance of natural hardwood and secondary coniferous forest soils in central Taiwan. *Microbial Ecology* **61** (2): 429-437.
- Lin Y.S., Stout J.E., Yu V.L. et Vidic R.D. (1998) Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Seminars in respiratory infections*. **13** (2): 147-159.
- Lindstrom E.S., Kamst-Van Agterveld M.P. et Zwart G. (2005) Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (12): 8201-8206.
- Liu J., Barry C.E., Besra G.S. et Nikaido H. (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the *Mycobacterial* cell wall. *Journal of Biological Chemistry* **271** (47): 29545-29551.
- Liu S.G., Zhu Z.L., Han C., Qiu Y.L. et Zhao J.F. (2009) Kinetics of monochloramine decay in disinfection of drinking water. *Journal of environment science Huanjing kexue* **30** (9): 2543-2549.
- Liu Z., Lin Y.E., Stout J.E., Hwang C.C., Vidic R.D. et Yu V.L. (2006) Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system. *Journal of Applied Microbiology* **101** (2): 437-442.
- Liu Z., Stout J.E., Tedesco L., Boldin M., Hwang C. et Yu V.L. (1995) Efficacy of ultraviolet light in preventing *Legionella* colonization of a hospital water distribution system. *Water Research* **29** (10): 2275-2280.
- Lloyd M. et Ghelardi R.J. (1964) A table for calculating the equitability component of species diversity. *Journal of Animal Ecology* **33** (2): 217-225.
- Lo Presti F., Riffard S., Jarraud S., Le Gallou F., Richet H., Vandenesch F. et Etienne J. (2000) Isolation of *Legionella oakridgensis* from two patients with pleural effusion living in the same geographical area. *Journal of Clinical Microbiology* **38** (8): 3128-3130.
- Lo Presti F., Riffard S., Meugnier H., Reyrolle M., Lasne Y., Grimont P.A., et al. (2001) *Legionella gresilensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51** (Pt 6): 1949-1957.
- 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** (11): 3193-3197.
- Lopez-Garcia P. et Moreira D. (2008) Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology* **159** (1): 67-73.
- Loret J.F., Robert S., Thomas V., Cooper A.J., McCoy W.F. et Levi Y. (2005) Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *Journal of Water and Health* **3** (4): 423-433.
- Lu Shih K. et Lederberg J. (1976) Effects of chloramine on *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* **125** (3): 934-945.
- Luck P.C., Leupold I., Hlawitschka M., Helbig J.H., Carmienke I., Jatzwauk L. et Guderitz T. (1993) Prevalence of *Legionella* species, serogroups, and monoclonal subgroups in hot water systems in south-eastern Germany. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* **193** (5): 450-460.
- Ludwig W., Strunk O., Klugbauer S., Klugbauer N., Weizenegger M., Neumaier J., et al. (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19** (4): 554-568.
- Luh J., Tong N., Raskin L. et Marinas B.J. (2008) Inactivation of *Mycobacterium avium* with monochloramine. *Environmental Science and Technology* **42** (21): 8051-8056.

M

- MacArthur R.H. (1957) On the relative abundance of bird species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **43** (3): 293-295.
- Maes N., Wauters G. et Struelens M.J. (1998) Evaluation of arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis for typing *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology and Infection* **4** (3): 149-154.

- Magurran A.E.** (1988) *Ecological diversity and its measurement*. Princeton, New Jersey: **Princeton University Press**.
- Maillard J.Y.** (2002) Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology* **92**: 165-275.
- Maillard J.Y.** (2007) Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *Journal of Hospital Infection* **65** (Supplement 2): 60-72.
- Malato S., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M.I., Blanco J. et Gernjak W.** (2009) Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. *Catalysis Today* **147** (1): 1-59.
- Malik S., Beer M., Megharaj M. et Naidu R.** (2008) The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International* **34** (2): 265-276.
- Maller I.M., Jensen P.E. et Hansson A.** (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58** (1): 459-481.
- Mampel J., Spirig T., Weber S.S., Haagenen J.A.J., Molin S. et Hilbi H.** (2006) Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (4): 2885-2895.
- Marchand A., Verdon J., Lacombe C., Crapart S., Héchard Y. et Berjeaud J.M.** (2011) Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides* **32** (5): 845-851.
- Marciano C., Francine, Jamerson, Melissa, Kaneshiro et Edna S.** (2010) Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *Journal of Water and Health* **8** (1): 71-82.
- Marmet D., Bornstein N. et Fleurette J.** (1988) Identification of *Legionella* by gas phase chromatography of fatty acids and high performance liquid chromatography of ubiquinones. *Annales de Biologie Clinique* **46** (6): 371-375.
- Maron P.A., Mougél C., Siblot S., Abbas H., Lemanceau P. et Ranjard L.** (2007) Protein extraction and fingerprinting optimization of bacterial communities in natural environment. *Microbial Ecology* **53** (3): 426-434.
- Marshall K.C.** (1994) Microbial ecology: whither goest thou? In *Trends in microbial ecology: proceedings of the sixth International Symposium on Microbial Ecology*. Guerrero, R., Pedros-Alio, C. et Microbiología, S.E.d. (eds). Barcelona: **Spanish Society for Microbiology**, pp. 5-8.
- Martin M.O.** (2002) Predatory prokaryotes: an emerging research opportunity. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **4** (5): 467-477.
- Masin M., Jezbera J., Nedoma J., Straskrabova V., Hejzlar J. et Simek K.** (2003) Changes in bacterial community composition and microbial activities along the longitudinal axis of two canyon-shaped reservoirs with different inflow loading. *Hydrobiologia* **504** (1): 99-113.
- Mastropaolo M.D., Evans N.P., Byrnes M.K., Stevens A.M., Robertson J.L. et Melville S.B.** (2005) Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infection and Immunity* **73** (9): 6055-6063.
- Mathieu L., Bouteleux C., Fass S., Angel E. et Block J.C.** (2009) Reversible shift in the α -, β - and γ -proteobacteria populations of drinking water biofilms during discontinuous chlorination. *Water Research* **43** (14): 3375-3386.
- Mathys W., Stanke J., Harmuth M. et Junge-Mathys E.** (2008) Occurrence of *Legionella* in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **211** (1-2): 179-185.
- Matz C., Flemming H.C., Wingender J. et Szewzyk U.** (2011) Competition, communication, cooperation: molecular crosstalk in multi-species biofilms. In *Biofilm Highlights*. Flemming, H.C., Wingender, J. et Szewzyk, U. (eds): **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, pp. 29-40.
- Mayali X., Palenik B. et Burton R.S.** (2010) Dynamics of marine bacterial and phytoplankton populations using multiplex liquid bead array technology. *Environmental Microbiology* **12** (4): 975-989.
- Mayberry W.R.** (1984) Monohydroxy and dihydroxy fatty acid composition of *Legionella* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34** (3): 321-326.
- Mazurek G.H., Reddy V., Marston B.J., Haas W.H. et Crawford J.T.** (1996) DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *Journal of Clinical Microbiology* **34** (10): 2386-2390.
- McBain A.J., Rickard A.H. et Gilbert P.** (2002) Possible implications of biocide accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29** (6): 326-330.
- McDade J.E.** (2002) Legionnaires' disease 25 years later: lessons learned. In *Legionella*. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N.P., Field, B.S., Frosch, M., et al. (eds). Washington, D.C.: **ASM Press**, pp. 1-10.
- McDade J.E., Shepard C.C., Fraser D.W., Tsai T.R., Redus M.A. et Dowdle W.R.** (1977) Legionnaires' disease - isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine* **297** (22): 1197-1203.
- McMurry L.M., McDermott P.F. et Levy S.B.** (1999) Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for Triclosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (3): 711-713.
- Meenhorst P.L., Reingold A.L., Gorman G.W., Feeley J.C., van Cronenburg B.J., Meyer C.L.M. et van Furth R.** (1983) *Legionella* pneumonia in guinea pigs exposed to aerosols of concentrated potable water from a hospital with nosocomial Legionnaires' disease. *Journal of Infectious Diseases* **147** (1): 129-132.
- Mekkour M., Ben Driss E., Tai J., Squinazi F., Forey F., Jarraud S. et Cohen N.** (2012) Molecular typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from environment in Morocco. *Cellular and Molecular Biopsy* **58** (Supplément).
- Miki T. et Yamamura N.** (2005) Intraguild predation reduces bacterial species richness and loosens the viral loop in aquatic systems: "kill the killer of the winner" hypothesis. *Aquatic Microbial Ecology* **40** (1): 1-12.
- Miller R.D.** (1983) *Legionella pneumophila* cell envelope: permeability to hydrophobic molecules. *Current Microbiology* **9** (6): 349-354.
- Ministre de la Santé et des Solidarités** (2005) Circulaire N°DGS/SD5C/SD7A/DESUS/2005/323 du 11 juillet 2005 relative à la diffusion du guide d'investigation et d'aide à la gestion d'un ou plusieurs cas de légionellose. Direction Générale de la Santé, p. 4.
- Mitch W.A. et Sedlak D.L.** (2004) Characterization and fate of N-nitrosodimethylamine precursors in municipal wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology* **38** (5): 1445-1454.
- Moe S.J., Stelzer R.S., Forman M.R., Harpole W.S., Daufresne T. et Yoshida T.** (2005) Recent advances in ecological stoichiometry: insights for population and community ecology. *Oikos* **109** (1): 29-39.
- Mogoa E.** (2010) Etude du mécanisme d'action de biocides oxydants sur *Acanthamoeba castellanii*. UNIVERSITE DE POITIERS

- Moissenet D., Vu-Thien H., Benzerara Y. et Arlet G.** (2003) DNA fingerprinting of *Ralstonia paucula* by infrequent-restriction-site PCR and randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **41** (12): 5747-5749.
- Moliner C., Ginevra C., Jarraud S., Flaudrops C., Bedotto M., Couderc C., et al.** (2010) Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology* **59** (3): 273-284.
- Molmeret M.** (2001) Réplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* : des amibes aux macrophages. Université Claude Bernard-Lyon1
- Molmeret M., Bitar D.M., Han L. et Kwaik Y.A.** (2004) Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection* **6** (1): 129-139.
- Molmeret M.I., Horn M., Wagner M., Santic M. et Abu Kwaik Y.** (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (1): 20-28.
- 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** (2): 445-461.
- Molofsky A.B. et Swanson M.S.** (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology* **53** (1): 29-40.
- Montanaro-Punzengruber J.C., Hicks L., Meyer W. et Gilbert G.L.** (1999) Australian isolates of *Legionella longbeachae* are not a clonal population. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (10): 3249-3254.
- Moore M.R., Pryor M., Fields B., Lucas C., Phelan M. et Besser R.E.** (2006) Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (1): 378-383.
- Morin P.J.** (2011) *Community ecology*. New Brunswick: John Wiley & Sons.
- Morris C.E., Bardin M., Berge O., Frey-Klett P., Fromin N., Girardin H., et al.** (2002) Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66** (4): 592-616.
- Morton S., Bartlett C.L., Bibby L.F., Hutchinson D.N., Dyer J.V. et Dennis P.J.** (1986) Outbreak of legionnaires' disease from a cooling water system in a power station. *British Journal of Industrial Medicine* **43** (9): 630-635.
- Moss C.W. et Dees S.B.** (1979) Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires disease bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **9** (5): 648-649.
- Motomura I.** (1932) A statistical treatment of associations. *Japanese Journal of Zoology* **44**: 379-383.
- Mühling M., Fuller N.J., Millard A., Somerfield P.J., Marie D., Wilson W.H., et al.** (2005) Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton. *Environmental Microbiology* **7** (4): 499-508.
- 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** (3): 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** (2): 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** (11): 3121-3126.
- Murgel G.A., Lion L.W., Acheson C., Shuler M.L., Emerson D. et Ghiorse W.C.** (1991) Experimental apparatus for selection of adherent microorganisms under stringent growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (7): 1987-1996.
-
- ## N
-
- Nagl M. et Gottardi W.** (1998) Rapid killing of *Mycobacterium terrae* by N-chlorotaurine in the presence of ammonium is caused by the reaction product monochloramine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **50** (11): 1317-1320.
- Nakae T., Nakajima A., Ono T., Saito K. et Yoneyama H.** (1999) Resistance to beta -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the mexAB-oprM efflux pump and beta -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (5): 1301-1303.
- Nalin R., L. Ranjard, S. Nazaret et P.W. Simonet** (1998) La biologie moléculaire en écologie microbienne du sol : application à l'analyse de la structure des communautés bactériennes. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **13**: 21-26.
- Nederbragt A.J., Balasingham A., Sirevag R., Utkilen H., Jakobsen K.S. et Anderson-Glenne M.J.** (2008) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Legionella pneumophila* using multi-colored capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* **73** (2): 111-117.
- Neumeister B., Schöniger 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** (4): 1219-1224.
- 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** (2): 449-452.
- Nichols D.S.** (2003) Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiology Letters* **219** (1): 1-7.
- Nikaido H., Kim S.H. et Rosenberg E.Y.** (1993) Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Molecular Microbiology* **8** (6): 1025-1030.
- Nishihara T., Okamoto T. et Nishiyama N.** (2000) Biodegradation of didecyltrimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology* **88** (4): 641-647.
- Noller H., Van Stolk B., Moazed D., Douthwaite S. et Gutell R.** (1985) Studies on the structure and function of 16S ribosomal RNA using structure-specific chemical probes. *Journal of Biosciences* **8** (3): 747-755.
- Normark B.H. et Normark S.** (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* **252** (2): 91-106.
- 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** (1): 268-276.
-
- ## O
-
- O'Connell W.A., Hickey E.K. et Cianciotto N.P.** (1996) A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding. *Infection and Immunity* **64** (3): 842-848.
- O'Connor B., Carman J., Eckert K., Tucker G., Givney R. et Cameron S.** (2007) Does using potting mix make you sick? Results from a *Legionella longbeachae* case-control study in South Australia. *Epidemiology and Infection*. **135** (1): 34-39.

- Odum E.P. et Barrett G.W.** (1953) *Fundamentals of ecology*. Philadelphia, USA.
- Ogata N.** (2007) Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry* **46** (16): 4898-4911.
- Oguma K., Katayama H. et Ohgaki S.** (2004) Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp. *Water Research* **38** (11): 2757-2763.
- Ohno A., Kato N., Sakamoto R., Kimura S. et Yamaguchi K.** (2008) Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Applied and Environmental Microbiology* **74** (14): 4585-4588.
- Ohno A., Kato N., Yamada K. et Yamaguchi K.** (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (5): 2540-2547.
- Okamoto K., Gotoh N. et Nishino T.** (2001) *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to Penem antibiotics: Penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45** (7): 1964-1971.
- Oliver J.D., Dagher M. et Linden K.** (2005) Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *Journal of Water and Health* **3** (3): 249-257.
- Ortiz-Roque C.M. et Hazen T.C.** (1987) Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. *Applied and Environmental Microbiology* **53** (9): 2231-2236.
- Ott M., Paul M., Järge H., Reinhard M. et Järge H.** (1991) Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *Journal of General Microbiology* **137** (8): 1955-1961.
- Ozlem Sanli-Yurudu N., Kimiran-Erdem A. et Cotuk A.** (2007) Studies on the efficacy of chloramine T trihydrate (N-chloro-p-toluene sulfonamide) against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **210** (2): 147-153.
-
- P**
-
- Padilla C., Brevis P., Lobos O. et Hubert E.** (1996) Bacteriocin activity of *Pseudomonas* sp. on enteropathogenic bacteria in an artificial aquatic system. *Letters in Applied Microbiology* **23** (6): 371-374.
- Palin A.** (1950) A study of the chloro derivatives of ammonia. *Water and Water Engineering* **54**: 248-258.
- 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** (11): 3618-3624.
- Park M., Yun S.T., Kim M.S., Chun J. et Ahn T.I.** (2004) Phylogenetic characterization of *Legionella*-like endosymbiotic X-bacteria in *Amoeba proteus*: a proposal for candidatus *Legionella jeonii* sp. nov. *Environmental Microbiology* **6** (12): 1252-1263.
- Parthuisot N., West N.J., Lebaron P. et Baudart J.** (2010) High diversity and abundance of *Legionella* spp. in a pristine river and impact of seasonal and anthropogenic effects. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (24): 8201-8210.
- Paszko-kolva C., Hacker P.A., Stewart M.H. et Wolfe R.L.** (1993a) Inhibitory effect of heterotrophic bacteria on the cultivation of *Legionella dumoffii*. In *Legionella: Current status and emerging perspectives*. Press, A. (ed), pp. 203-205.
- Paszko-Kolva C., Shahamat M. et Colwell R.R.** (1993b) Effect of temperature on survival of *Legionella pneumophila* in the aquatic environment. *Microbial Releases* **2** (2): 73-79.
- Pattison D.I. et Davies M.J.** (2001) Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chemical Research in Toxicology* **14** (10): 1453-1464.
- Paulsen I.T., Brown M.H. et Skurray R.A.** (1998) Characterization of the earliest known *Staphylococcus aureus* plasmid encoding a multidrug efflux system. *Journal of Bacteriology* **180** (13): 3477-3479.
- Paulsen I.T., Littlejohn T.G., Radstrom P., Sundstrom L., Skold O., Swedberg G. et Skurray R.A.** (1993) The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37** (4): 761-768.
- Pedersen K.** (1990) Biofilm development on stainless steel and pvc surfaces in drinking water. *Water Research* **24** (2): 239-243.
- Peet R.K.** (1974) The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **5**: 285-307.
- Pernthaler J.** (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology* **3** (7): 537-546.
- Pernthaler J., Glockner F.O., Unterholzner S., Alfreider A., Psenner R. et Amann R.** (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (11): 4299-4306.
- 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** (12): 863-868.
- Perola O., Kauppinen J., Kusnetsov J., Karkkainen U.M., Luck P.C. et Katila M.L.** (2005) Persistent *Legionella pneumophila* colonization of a hospital water supply: efficacy of control methods and a molecular epidemiological analysis. *APMIS* **113** (1): 45-53.
- Personnic S., Duhamel S., Bettarel Y., Sime-Ngando T. et Jacquet S.** (2006) Les virus planctoniques : un compartiment biologique clé des milieux aquatiques. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* **53**: 19-34.
- Phe M.H., Dossot M. et Block J.C.** (2004) Chlorination effect on the fluorescence of nucleic acid staining dyes. *Water Research* **38** (17): 3729-3737.
- Phe M.H., Dossot M., Guilloteau H. et Block J.C.** (2007) Highly chlorinated *Escherichia coli* cannot be stained by propidium iodide. *Canadian Journal of Microbiology* **53** (5): 664-670.
- Piao Z., Sze C.C., Barysheva O., Iida K.I. et Yoshida S.I.** (2006) Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (2): 1613-1622.
- Pielou E.C.** (1975) *Ecological diversity*: Wiley.
- 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** (5): 615-626.
- Poitelon J.B., Joyeux M., Welté B., Duguet J.P., Prestel E. et DuBow M.** (2010) Variations of bacterial 16S rDNA phylotypes prior to and after chlorination for drinking water production from two surface water treatment plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **37** (2): 117-128.
- Poole K.** (2001) Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **3** (2): 255-264.
- Poole K.** (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56** (1): 20-51.

Poon R., Lecavalier P., Tryphonas H., Bondy G., Chen M., Chu I., et al. (1997) Effects of subchronic exposure of monochloramine in rinking water on male rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **25** (2): 166-175.

Pope D.H., Soracco R.J., Gill H.K. et Fliermans C.B. (1982) Growth of *Legionella pneumophila* in two-membered cultures with green algae and cyanobacteria. *Current Microbiology* **7** (5): 319-321.

Pougnard C., Catala P., Drocourt J.L., Legastelois S., Pernin P., Pringuez E. et Lebaron P. (2002) Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (6): 3102-3107.

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** (5): 1819-1826.

Pourcel C., Visca P., Afshar B., D'Arezzo S., Vergnaud G. et Fry N.K. (2007) Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology* **45** (4): 1190-1199.

Preston F.W. (1948) The commonness, and rarity, of species. *Ecology* **29** (3): 254-283.

Pruckler J.M., Mermel L.A., Benson R.F., Giorgio C., Cassidy P.K., Breiman R.F., et al. (1995) Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *Journal of Clinical Microbiology* **33** (11): 2872-2875.

Pryor M., Springthorpe S., Riffard S., Brooks T., Huo Y., Davis G. et Sattar S.A. (2004) Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Science and Technology* **50** (1): 83-90.

Q

Qi Y., Shang C. et Lo I.M.C. (2004) Formation of haloacetic acids during monochloramination. *Water Research* **38** (9): 2375-2383.

R

Raaijmakers J.G.W. (1987) Statistical analysis of the Michaelis-Menten equation. *Biometrics*. **43** (4): 793-803.

Radl V., Pritsch K., Munch J.C. et Schlöter M. (2005) Structural and functional diversity of microbial communities from a lake sediment contaminated with trenbolone, an endocrine-disrupting chemical. *Environmental Pollution* **137** (2): 345-353.

Ragull S., Garcia-Nunez M., Pedro-Botet M.L., Sopena N., Esteve M., Montenegro R. et Sabria M. (2007) *Legionella pneumophila* in cooling towers: fluctuations in counts, determination of genetic variability by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and persistence of PFGE patterns. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (16): 5382-5384.

Rajendhran J. et Gunasekaran P. (2010) Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research In Press*, Corrected Proof.

Ramseier M.K., von Gunten U., Freihofer P. et Hammes F. (2011) Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate (VI), and permanganate. *Water Research* **45** (3): 1490-1500.

Rastogi G., Sani R.K., Ahmad I., Ahmad F. et Pichtel J. (2011) Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In *Microbes and Microbial Technology*. Ahmad, I., Ahmad, F. et Pichtel, J. (eds). New York: Springer New York, pp. 29-57.

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** (6): 1560-1567.

Ratzow S., Gaia V., Helbig J.H., Fry N.K. et Luck P.C. (2007) Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminase cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology* **45** (6): 1965-1968.

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** (4): 688-695.

Rennecker J.L., Driedger A.M., Rubin S.A. et Mariñas B.J. (2000) Synergy in sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* with ozone/free chlorine and ozone/monochloramine. *Water Research* **34** (17): 4121-4130.

Rennecker J.L., Kim J.H., Corona-Vasquez B. et Mariñas B.J. (2001) Role of disinfectant concentration and pH in the inactivation kinetics of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and monochloramine. *Environmental Science and Technology* **35** (13): 2752-2757.

Richardson I.R. (1990) The incidence of *Bdellovibrio* spp. in man-made water systems: coexistence with legionellas. *Journal of Applied Microbiology* **69** (1): 134-140.

Ridgway H.F. et Olson B.H. (1982) Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **44** (4): 972-987.

Riffard S., Lo Presti F., Normand P., Forey F., Reyrolle M., Etienne J. et Vandenesch F. (1998a) Species identification of *Legionella* via intergenic 16S-23S ribosomal spacer PCR analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48 Pt 3**: 723-730.

Riffard S., Lo Presti F., Vandenesch F., Forey F., Reyrolle M. et Etienne J. (1998b) 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** (1): 161-167.

Riffard S., Springthorpe S., Filion L. et Sattar S.A. (2003) Occurrence of *Legionella* in groundwater. Ottawa, Canada: Awwa research foundation.

Rivera J.M., Aguilar L., Granizo J.J., Vos-Arenilla A., Giménez M.J., Aguiar J.M. et Prieto J. (2007) Isolation of *Legionella* species/serogroups from water cooling systems compared with potable water systems in Spanish healthcare facilities. *Journal of Hospital Infection* **67** (4): 360-366.

Rocha E.R. et Smith C.J. (1999) Role of the alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) gene in oxidative stress defense of the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology* **181** (18): 5701-5710.

Roeder R.S., Lenz J., Tarne P., Gebel J.r., Exner M. et Szewzyk U. (2010) Long-term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **213** (3): 183-189.

Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V. et 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** (5): 1585-1592.

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** (7): 2326-2330.

- 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** (5): 1822-1824.
- Rossello-Mora R. et Amann R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25** (1): 39-67.
- Rowbotham T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology* **33** (12): 1179-1183.
- Rowbotham T.J. (1986) Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Israel Journal of Medical Sciences* **22** (9): 678-689.
- Russell A.D. (1995) Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 247-265.
- Russell A.D. (1997) Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of Applied Microbiology* **83** (2): 155-165.
- Russell A.D. (2001) Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *American Journal of Infection Control* **29** (4): 259-261.
- Russell A.D. (2003) Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases* **3** (12): 794-803.
- Russell A.D., Furr J.R. et Pugh W.J. (1987) Sequential loss of outer membrane lipopolysaccharide and sensitivity of *Escherichia coli* to antibacterial agents. *International Journal of Pharmaceutics* **35** (3): 227-233.
-
- S**
-
- Sabath L.D., Laverdiere M., Wheeler N., Blazevic D. et Wilkinson B. (1977) A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* **309** (8009): 443-447.
- Sabria M., Garcia-Nunez M., Pedro-Botet M.L., Sopena N., Gimeno J.M., Reynaga E., et al. (2001) Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **22** (11): 673-676.
- Saby S.B., Leroy P. et Block J.C. (1999) *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (12): 5600-5603.
- Sadosky A.B., Wilson J.W., Steinman H.M. et Shuman H.A. (1994) The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *Journal of Bacteriology* **176** (12): 3790-3799.
- Safe Drinking Water Committee et National Research Council (1987) *Drinking water and health, disinfectants and disinfectant by-products.*: The National Academies Press.
- Sakallah S., Pasculle W., Lanning R., McDevitt D. et Cooper D. (1995) Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates by degenerate (D-)RAPD fingerprinting. *Molecular and Cellular Probes* **9** (6): 405-414.
- Sakamoto R., Ohno A., Nakahara T., Satomura K., Iwanaga S., Kouyama Y., et al. (2009) *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. *Emerging Infectious Diseases* **15** (8): 1295-1297.
- Salloum G., Meugnier H., Reyrolle M., Grimont F., Grimont P.A., Etienne J. et Freney J. (2002) Identification of *Legionella* species by ribotyping and other molecular methods. *Research in Microbiology* **153** (10): 679-686.
- Samrakandi M.M., Roques C. et Michel G. (1997) Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Canadian Journal of Microbiology* **43** (8): 751-758.
- Sanchez I., Garcia-Nunez M., Ragull S., Sopena N., Pedro-Botet M.L., Rey-Joly C., et al. (2008) Genotypic variability and persistence of *Legionella pneumophila* PFGE patterns in 34 cooling towers from two different areas. *Environmental microbiology* **10** (2): 395-399.
- Sanden G.N., Fields B.S., Barbaree J.M. et Feeley J.C. (1989) Viability of *Legionella pneumophila* in choline-free water at elevated temperatures. *Current Microbiology* **18** (1): 61-65.
- 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** (6): 2001-2004.
- Sanders H. (1968) Marine benthic diversity: a comparative study. *The American Naturalist* **102** (925): 243-282.
- Saunders N.A., Harrison T.G., Haththotuwa A., Kachwalla N. et Taylor A.G. (1990) A method for typing strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Journal of Medical Microbiology* **31** (1): 45-55.
- 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** (3): 152-158.
- Scarpino P.V., Berg G., Chang S.L., Dahling D. et Lucas M. (1972) A comparative study of the inactivation of viruses in water by chlorine. *Water Research* **6** (8): 959-965.
- Scarpino P.V., Lucas M., Dahling D.R., Berg G. et Chang S.L. (1973) Effectiveness of hypochlorous acid and hypochlorite ion in destruction of viruses and bacteria. In *American chemical society symposium on the chemistry of water supply, treatment, and distribution*. Rubin, A.J. (ed). Dallas, Texas: Ann Arbor Science Publishers, pp. 359-368.
- Scaturro M., Losardo M., De Ponte G. et Ricci M.L. (2005) Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of Legionellosis in Rome. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (10): 5348-5350.
- Scaturro M.P., Dell'Acqua I.M., Helfer F.M. et Ricci M.À L.M.D. (2007) Persistence of the same Strain of *Legionella pneumophila* in the water system of an Italian hospital for 15 years. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **28** (9): 1089-1092.
- Schade J.D., Espeleta J.F., Klausmeier C.A., McGroddy M.E., Thomas S.A. et Zhang L. (2005) A conceptual framework for ecosystem stoichiometry: balancing resource supply and demand. *Oikos* **109** (1): 40-51.
- Schaible U.E. et Kaufmann S.H.E. (2005) A nutritive view on the host pathogen interplay. *Trends in Microbiology* **13** (8): 373-380.
- Schloss P.D. et Handelsman J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (3): 1501-1506.
- Schmitt J. et Flemming H.C. (1999) Water binding in biofilms. *Water science and technology* **39** (7): 77-82.
- Schoen M.E. et Ashbolt N.J. (2011) An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events. *Water Research* **45** (18): 5826-5836.
- Schoonmaker D., Heimberger T. et Birkhead G. (1992) Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* **30** (6): 1491-1498.
- Schottel J.L. (1977) The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **253** (12): 4341-4349.

- Schwartz D.C. et Cantor C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37** (1): 67-75.
- Sedgwick A.K. et Tilton R.C. (1983) Identification of *Legionella pneumophila* by latex agglutination. *Journal of Clinical Microbiology* **17** (2): 365-368.
- Segers P., Vancanneyt M., Pot B., Torck U., Hoste B., Dewettinck D., et al. (1994) Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44** (3): 499-510.
- Seidel C.J., McGuire M.J., Summers R.S. et Via S. (2005) Have utilities switched to chloramines? *Journal American Water Works Association* **97** (10): 87-97.
- Sekar R., Fuchs B.M., Amann R. et Pernthaler J. (2004) Flow sorting of marine bacterioplankton after fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (10): 6210-6219.
- 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** (3): 1021-1037.
- Shannon C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* **27**: 379-423, 623-656.
- Shannon C.E. et Weaver W. (1949) *The Mathematical Theory of Communication*: University of Illinois Press.
- Shaw A.K., Halpern A.L., Beeson K., Tran B., Venter J.C. et Martiny J.B.H. (2008) It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities. *Environmental Microbiology* **10** (9): 2200-2210.
- Sheehan K.B., Henson J.M. et Ferris M.J. (2005) *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (1): 507-511.
- Shirtliff M.E., Mader J.T. et Camper A.K. (2002) Molecular interactions in biofilms. *Chemistry and Biology* **9** (8): 859-871.
- Sies H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* **82** (2): 291-295.
- Silver S. (2003) Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews* **27** (2-3): 341-353.
- Simoes L.C., Simoes M. et Vieira M.J. (2010) Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (19): 6673-6679.
- Simpson E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.
- Small D., Chang W., Toghrol F. et Bentley W. (2007) Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74** (1): 176-185.
- 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** (9): 2742-2749.
- Snaird J., Amann R., Huber I., Ludwig W. et Schleifer K.H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (7): 2884-2896.
- Snell-Castro R. (2004) Caractérisation de la communauté microbienne de lisier et de fumiers de porcs par des méthodes moléculaires. Université Montpellier II
- Sobral D., Le Cann P., Gerard A., Jarraud S., Lebeau B., Loisy-Hamon F., et al. (2011) High-throughput typing method to identify a non-outbreak-involved *Legionella pneumophila* strain colonizing the entire water supply system in the town of Rennes, France. *Applied and Environmental Microbiology* **77** (19): 6899-6907.
- Sockett R.E. (2009) Predatory lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annual Review of Microbiology* **63** (1): 523-539.
- Sonesson A., Moll H., Jantzen E. et Zähringer U. (1993) Long-chain α -hydroxy-(ω -1)-oxo fatty acids and α -hydroxy-1, ω -dioic fatty acids are cell wall constituents of *Legionella* (*L. jordanis*, *L. maceachernii* and *L. micdadei*). *FEMS Microbiology Letters* **106** (3): 315-320.
- Sowell S.M., Abraham P.E., Shah M., Verberkmoes N.C., Smith D.P., Barofsky D.F. et Giovannoni S.J. (2011) Environmental proteomics of microbial plankton in a highly productive coastal upwelling system. *ISME Journal* **5** (5): 856-865.
- Spickett C.M. (2007) Chlorinated lipids and fatty acids: an emerging role in pathology. *Pharmacology Therapeutics* **115** (3): 400-409.
- Spiegelman D., Whissell G. et Greer C.W. (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 355-386.
- Spiteller G. (1998) Linoleic acid peroxidation, the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein, and its relationship to chronic diseases. *Chemistry and Physics of Lipids* **95** (2): 105-162.
- Srinivasan A.M.D., Bova G., Ross T.B.S.N., Mackie K.R.N., Paquette N.B.S., Merz W.P. et Perl T.M.M.D. (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** (8): 575-579.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maiden M.C.J., et al. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52** (3): 1043-1047.
- Stackebrandt E. et Goebel B.M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44** (4): 846-849.
- Stadtman E.R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry* **62** (1): 797-821.
- Staley J.T. (2009) The phylogenomic species concept for bacteria and archaea. *Microbe* **4** (8): 361-365.
- Starkenbourg S.R., Casey J.M. et Cianciotto N.P. (2004) Siderophore activity among members of the *Legionella* genus. *Current Microbiology* **49** (3): 203-207.
- States S.J., Conley L.F., Ceraso M., Stephenson T.E., Wolford R.S., Wadowsky R.M., et al. (1985) Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and Environmental Microbiology* **50** (5): 1149-1154.
- Steele T.W., Moore C.V. et Sangster N. (1990) Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other legionellae in potting soils in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* **56** (10): 2984-2988.
- 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** (5): 2047-2053.
- Steinert M., Hentschel U. et Hacker J. (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews* **26** (2): 149-162.
- Stojek N. et Dutkiewicz J. (2006) *Legionella* and other gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban

- p>sources.
- Annals of Agricultural and Environmental Medicine*
- 13**
- (2): 323-335.
- Stoodley P., Boyle J.D., DeBeer D. et Lappin-Scott H.M.** (1999) Evolving perspectives of biofilm structure. *Biofouling* **14** (1): 75-90.
- Storey M.V., Langmark J., Ashbolt N.J. et Stenstrom T.A.** (2004) The fate of legionellae within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment. *Water Science and Technology* **49** (11-12): 269-275.
- Stout J.E., RIHS J.D. et YU V.L.** (2003) *Legionella*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition. MURRAY, P.R. (ed). Washington DC: ASM Press, pp. 809-823.
- Stout J.E., Yu V.L. et Best M.G.** (1985) Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **49** (1): 221-228.
- Stout J.E., Yu V.L., Yee Y.C., Vaccarello S., Diven W. et Lee T.C.** (1992) *Legionella pneumophila* in residential water supplies: environmental surveillance with clinical assessment for Legionnaires' disease. *Epidemiology and Infection* **109** (1): 49-57.
- Struelens M.J.** (1996) Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology and Infection* **2** (1): 2-11.
- Surman S., Morton G., Keevil B. et Fitzgeorge R.** (2002) *Legionella pneumophila* proliferation is not dependant on intracellular replication. In *Legionella*. Marre, R., Y., A.K., Bartlett, C.L., Cianciotto, N.P., Field, B.S., Frosch, M., et al. (eds). Washington DC: ASM Press, pp. 86-89.
- Sutherland I.W.** (2001) The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* **9**: 222 - 227.
- Swango L.J., Wilt G.R., Killen A.D., Williams D.E. et Worley S.D.** (1987) Inactivation of *Legionella pneumophila* by hypochlorite and an organic chloramine. *Applied and Environmental Microbiology* **53** (12): 2983-2986.
- Swanson M.S. et Hammer B.K.** (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology* **54** (1): 567-613.
- Symons J.M., Carswell J.K., Clarke R.M., Dorsey P., Geldreich E.E., Heffernan W.P., et al.** (1977) *Ozone, chlorine dioxide, and chloramines as alternatives to chlorine for disinfection of drinking water: state-of-the-art: presented at Second Conference on Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*. Gatlinburg, Tennessee: **Water Supply Research, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency**.
- T**
-
- Tamura K., Dudley J., Nei M. et Kumar S.** (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24** (8): 1596-1599.
- Taretgen I.** (2004) Comparison of the efficacy of free residual chlorine and monochloramine against biofilms in model and full scale cooling towers. *Biofouling* **20** (2): 81-85.
- 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** (4): 1702-1705.
- Temmerman R., Vervaeren H., Nosedá B., Boon N. et Verstraete W.** (2006) Necrotrophic Growth of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (6): 4323-4328.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. et Swaminathan B.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33** (9): 2233-2239.
- Tesh M.J. et Miller R.D.** (1981) Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. *Journal of Clinical Microbiology* **13** (5): 865-869.
- Thacker L., McKinney R.M., Moss C.W., Sommers H.M., Spivack M.L. et O'Brien T.F.** (1981) Thermophilic sporeforming bacilli that mimic fastidious growth characteristics and colonial morphology of legionellae. *Journal of Clinical Microbiology* **13** (4): 794-797.
- Theron J. et Cloete T.E.** (2000) Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology* **26** (1): 37-57.
- Thingstad T.F. et Lignell R.** (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology* **13** (1): 19-27.
- Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J. et Lévi Y.** (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology* **97** (5): 950-963.
- Thomas W.M., Eccles J. et Fricker C.** (1999) *Laboratory observations of biocide efficiency against Legionella in model cooling tower systems*.
- Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J. et Gerba C.P.** (2003) Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (7): 3979-3985.
- Thurston J.M., Williams E.D. et Johnston A.E.** (1976) Modern developments in an experiment on permanent grassland started in 1856: effects of fertilisers and lime on botanical composition and crop and soil analysis. *Annals of Agronomy* **27**: 1043-1082.
- Tijet N., Tang P., Romilowych M., Duncan C., Ng V., Fisman D.N., et al.** (2010) New endemic *Legionella pneumophila* serogroup I clones, Ontario, Canada. *Emerging Infectious Diseases* **16** (3): 447-454.
- 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** (2): 456-459.
- Tison D.L. et Seidler R.J.** (1983) *Legionella* incidence and density in potable drinking water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* **45** (1): 337-339.
- Tokajian S.T., Hashwa F.A., Hancock I.C. et Zalloua P.A.** (2005) Phylogenetic assessment of heterotrophic bacteria from a water distribution system using 16S rDNA sequencing. *Canadian Journal of Microbiology* **51** (4): 325-335.
- 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. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* **252** (1): 96-100.
- Torsvik V., Ovreas L. et Thingstad T.F.** (2002) Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296** (5570): 1064-1066.
- Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.A. et Ovreas L.** (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* **64** (1): 53-62.
- Toze S., Cahill M., Sly L.I. et Fuerst J.A.** (1994) The effect of *Aeromonas* strains on the growth of *Legionella*. *Journal of Applied Microbiology* **77** (2): 169-174.
- 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** (2): 139-143.
- Traczewski M.M., Katz B.D., Steenbergen J.N. et Brown S.D.** (2009) Inhibitory and bactericidal activities of Daptomycin, Vancomycin, and Teicoplanin against Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus isolates collected from 1985 to 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53** (5): 1735-1738.

Traxler M.F., Summers S.M., Nguyen H.T., Zacharia V.M., Hightower G.A., Smith J.T. et Conway T. (2008) The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **68** (5): 1128-1148.

Tresse O., Lescob S. et Rho D. (2003) Dynamics of living and dead bacterial cells within a mixed-species biofilm during toluene degradation in a biotrickling filter. *Journal of applied microbiology* **94** (5): 849-854.

Tsiamis G., Katsaveli K., Ntougias S., Kyrpides N., Andersen G., Piceno Y. et Bourtzis K. (2008) Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern. *Research in Microbiology* **159** (9-10): 609-627.

Tully M. (1991) A plasmid from a virulent strain of *Legionella pneumophila* is conjugative and confers resistance to ultraviolet light. *FEMS Microbiology Letters* **90** (1): 43-48.

Tumah H.N. (2009) Bacterial biocide resistance. *Journal of Chemotherapy* **21** (1): 5-15.

Tuomanen E., Durack D.T. et Tomasz A. (1986) Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30** (4): 521-527.

Turetgen I., Sungur E. et Cotuk A. (2005) Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems. *Environmental Monitoring and Assessment* **100** (1): 53-58.

Tyndall R.L. et Domingue E.L. (1982) Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Applied and Environmental Microbiology* **44** (4): 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*. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. et Dufour, A.P. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 142-145.

U

United-Nations (1992) Convention on biological diversity.

USEPA (1999) *Alternative disinfectants and oxidants guidance manual*. Office of water.

V

Vachée A., Mossel D.A.A. et Leclerc H. (1997) Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin. *Journal of Applied Microbiology* **83** (5): 652-658.

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** (5): 405-413.

van Belkum A., Struelens M., de Visser A., Verbrugh H. et Tibayrenc M. (2001) Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews* **14** (3): 547-560.

van der Kooij D., Veenendaal H.R. et Scheffer W.J.H. (2005) Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Research* **39** (13): 2789-2798.

van der Mee-Marquet N., Domelier A.S., Arnault L., Bloc D., Laudat P., Hartemann P. et Quentin R. (2006) *Legionella anisa*, a possible indicator of water contamination by *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* **44** (1): 56-59.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. et Swings J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60** (2): 407-438.

Vandenesch F., Surgot M., Bornstein N., Paucod J.C., Marmet D., Isoard P. et Fleurette J. (1990) Relationship between free amoeba and *Legionella*: studies in vitro and in vivo. *Zentralblatt für Bakteriologie* **272** (3): 265-275.

Vauterin L., Vantomme R., Pot B., Hoste B., Swings J. et Kersters K. (1990) Taxonomic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* by means of phytopathological, phenotypic, protein electrophoretic and DNA hybridization methods. *Systematic and Applied Microbiology* **13** (2): 166-176.

Velicer G.J. (2003) Social strife in the microbial world. *Trends in Microbiology* **11** (7): 330-337.

Verdon J., Berjeaud J.M., Lacombe C. et Héchard Y. (2008) Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides* **29** (6): 978-984.

Verissimo A., Marrao G., da Silva F.G. et da Costa M.S. (1991) Distribution of *Legionella* spp. in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of Sao Miguel, Azores. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (10): 2921-2927.

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** (1): 41-49.

Vervaeren H., Temmerman R., Devos L., Boon N. et Verstraete W. (2006) Introduction of a boost of *Legionella pneumophila* into a stagnant-water model by heat treatment. *FEMS Microbiology Ecology* **58** (3): 583-592.

Visca P., D'Arezzo S., Ramisse F., Gelfand Y., Benson G., Vergnaud G., et al. (2011) Investigation of the population structure of *Legionella pneumophila* by analysis of tandem repeat copy number and internal sequence variation. *Microbiology* **157** (9): 2582-2594.

Visca P., Goldoni P., Luck P.C., Helbig J.H., Cattani L., Giltri G., et al. (1999) Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (7): 2189-2196.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.v.d., Hornes M., et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23** (21): 4407-4414.

W

Wadowsky R.M., Butler L.J., Cook M.K., Verma S.M., Paul M.A., Fields B.S., et al. (1988) Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors. *Applied and Environmental Microbiology* **54** (11): 2677-2682.

Wadowsky R.M., Wilson T.M., Kapp N.J., West A.J., Kuchta J.M., States S.J., et al. (1991) Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (7): 1950-1955.

Wadowsky R.M., Wolford R., McNamara A.M. et Yee R.B. (1985) Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Applied and Environmental Microbiology* **49** (5): 1197-1205.

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** (6): 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** (5): 1206-1210.

- 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 and Biotechnology* **15** (4): 384-390.
- Wallis L. et Robinson P. (2005) Soil as a source of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1). *Australian and New Zealand Journal of Public Health* **29** (6): 518-520.
- Walters M.C., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J. et Stewart P.S. (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (1): 317-323.
- Walther B.A. et Morand S. (1998) Comparative performance of species richness estimation methods. *Parasitology* **116**: 395-405.
- Wang S., Deng K., Zaremba S., Deng X., Lin C., Wang Q., et al. (2009) Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology* **75** (19): 6110-6123.
- Wang Z., Liao F., Lin J., Li W., Zhong Y., Tan P. et Huang Z. (2010) Inactivation and mechanisms of chlorine dioxide on *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **104** (2): 134-139.
- Watnick P. et Kolter R. (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* **182** (10): 2675-2679.
- Watson H.E. (1908) A note of the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *Journal of Hygiene* **8**: 536.
- Watsuji T.o., Kato T., Ueda K. et Beppu T. (2006) CO₂ supply induces the growth of *Symbiobacterium thermophilum*, a syntrophic bacterium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70** (3): 753-756.
- Watters S.K., Pyle B.H., LeChevallier M.W. et McFeters G.A. (1989) Enumeration of *Enterobacter cloacae* after chloramine exposure. *Applied and Environmental Microbiology* **55** (12): 3226-3228.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., et al. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37** (4): 463-464.
- Webb J.S., Thompson L.S., James S., Charlton T., Tolker-Nielsen T., Koch B., et al. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology* **185** (15): 4585-4592.
- Weber H., Polen T., Heuveling J., Wendisch V.F. et Hengge R. (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: s-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology* **187** (5): 1591-1603.
- Weinbauer M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* **28** (2): 127-181.
- Weinbauer M.G. et Rassoulzadegan F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology* **6** (1): 1-11.
- Welsh J. et McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18** (24): 7213-7218.
- Wenjun L., Raoult D. et Fournier P.E. (2009) Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews* **9999** (9999).
- Werner H.P. (1987) Presence and significance of *Legionella* in power station cooling systems. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser, Boden- und Lufthygiene* **72**: 147-153.
- Wery N., Bru-Adan V., Minervini C., Delgenes J.P., Garrelly L. et Godon J.J. (2008) Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (10): 3030-3037.
- Whittaker R.H. (1965) Dominance and diversity in land plant communities. *Science* **147** (3655): 250-260.
- WHO (2011) *Guidelines for drinking-water quality*. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**.
- Wiese J., Helbig J.H., Luck C., Meyer H.G., Jansen B. et Dunkelberg H. (2004) Evaluation of different primers for DNA fingerprinting of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains by polymerase chain reaction. *International Journal of Medical Microbiology* **294** (6): 401-406.
- Wikstrom P., Andersson A.C., Nygren Y., Sjöström J. et Forsman M. (2000) Influence of TNT transformation on microbial community structure in four different lake microcosms. *Journal of Applied Microbiology* **89** (2): 302-308.
- Wilkinson H.W. et Fikes B.J. (1980) Slide agglutination test for serogrouping *Legionella pneumophila* and atypical *Legionella*-like organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **11** (1): 99-101.
- Wilkinson I.J., Sangster N., Ratcliff R.M., Mugg P.A., Davos D.E. et Lanser J.A. (1990) Problems associated with identification of *Legionella* species from the environment and isolation of six possible new species. *Applied and Environmental Microbiology* **56** (3): 796-802.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. et Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18** (22): 6531-6535.
- Williams M.M., Domingo J.W.S., Meckes M.C., Kelty C.A. et Rochon H.S. (2004) Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *Journal of Applied Microbiology* **96** (5): 954-964.
- Wilmes P. et Bond P.L. (2006) Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiology* **14** (2): 92-97.
- Wilson I.G. (1997) Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (10): 3741-3751.
- Wimpenny J., Manz W. et Szezyk U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* **24** (5): 661-671.
- Wingender J. et Flemming H.C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **214** (6): 417-423.
- Winn W.C. (1988) Legionnaires disease: historical perspective. *Clinical Microbiological Reviews* **1** (1): 60-81.
- Winterbourn C.C., van den Berg J.J.M., Roitman E. et Kuypers F.A. (1992) Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **296** (2): 547-555.
- Wintermute E.H. et Silver P.A. (2010) Dynamics in the mixed microbial concourse. *Genes and Development* **24** (23): 2603-2614.
- Wolff M. (2002) Concepts and approaches for marine ecosystem research with reference to the tropics. *Revista de Biologia Tropical* **50**: 395-414.
- Wommack K.E. et Colwell R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64** (1): 69-114.
- 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 and Hospital Epidemiology* **10** (9): 408-415.
- Wu C.W., Schmoller S.K., Shin S.J. et Talaat A.M. (2007) Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in vitro and in naturally infected cows. *Journal of Bacteriology* **189** (21): 7877-7886.

Wu L., Kellogg L., Devol A.H., Tiedje J.M. et Zhou J. (2008) Microarray-based characterization of microbial community functional structure and heterogeneity in marine sediments from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (14): 4516-4529.

Wullings B.A., Bakker G. et van der Kooij D. (2011) Concentration and diversity of uncultured *Legionella* spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. *Applied and Environmental Microbiology* **77** (2): 634-641.

Wullings B.A. et Van der Kooij D. (2006) Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15 degrees C. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (1): 157-166.

X

Xu J. (2006) Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology* **15** (7): 1713-1731.

Y

Yamamoto H., Hashimoto Y. et Ezaki T. (1996) Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiology Ecology* **20** (3): 149-154.

Yamamoto H., Sugiura M., Kusunoki S., Ezaki T., Ikedo M. et Yabuuchi E. (1992) Factors stimulating propagation of *Legionellae* in cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (4): 1394-1397.

Yanez M.A., Carrasco-Serrano C., Barbera V.M. et Catalan V. (2005) Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (7): 3433-3441.

Yang G., Benson R., Pelish T., Brown E., Winchell J.M. et Fields B. (2010) Dual detection of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. *Clinical Microbiology and Infection* **16** (3): 255-261.

Yoo J.H., Choi J.H., Shin W.S., Huh D.H., Cho Y.K., Kim K.M., et al. (1999) Application of infrequent-restriction-site PCR to clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens*. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (10): 3108-3112.

Yu V.L., Plouffe J.F., Pastoris M.C., Stout J.E., Schousboe M., Widmer A., et al. (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** (1): 127-128.

Z

Zanetti F., Stampi S., De Luca G., Fateh Moghadam P., Bucci Sabattini M.A. et Checchi L. (2000) Water characteristics associated with the occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units. *European Journal of Oral Sciences* **108** (1): 22-28.

Zeph L.R. et Casida L.E. (1986) Gram-negative versus Gram-positive (*Actinomycete*) nonobligate bacterial predators of bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **52** (4): 819-823.

Zeybek Z., Turetgen I., Kimiran Erdem A., Filoglu G. et Cotuk A. (2009) Profiling of environmental *Legionella pneumophila* strains by randomly amplified polymorphic DNA method isolated from geographically nearby buildings. *Environmental Monitoring Assessment* **149** (1-4): 323-327.

Zhang X., Bishop P.L. et Kupferle M.J. (1998) Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology* **37** (4-5): 345-348.

Zhang Z., McCann C., Stout J., Piesczynski S., Hawks R., Vidic R. et Yu Victoria (2007) Safety and efficacy of chlorine dioxide for *Legionella* control in a hospital water system. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **28** (8): 1009-1012.

Zwart G., van Hanne E.J., Kamst-van Agterveld M.P., Van der Gucht K., Lindstrom E.S., Van Wichelen J., et al. (2003) Rapid Screening for Freshwater Bacterial Groups by Using Reverse Line Blot Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (10): 5875-5883.

ANNEXES

ANNEXE I : DECLARATION DES CAS DE LEGIONELLOSE

La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987 (décret n°87-1012). La déclaration doit être faite par le clinicien et par le biologiste (décret n° 99-362 du 6 Mai 1999 fixant les modalités de transmission à l'autorité sanitaire de données individuelles concernant les maladies visées à l'article L. 11 du code de la santé publique et modifiant le code de la santé publique).

La déclaration obligatoire consiste à recueillir des informations aussi exhaustives que possible concernant tous les cas de légionellose auprès des biologistes et médecins. Elle met en jeu deux procédures successives : le signalement et la notification.

Les médecins et les biologistes qui suspectent ou diagnostiquent un cas de légionellose doivent le signaler sans délai et par tout moyen approprié (téléphone, télécopie) au médecin inspecteur de santé publique des Agences Régionales de Santé (ARS) de leur lieu d'exercice. Le signalement permet au médecin inspecteur de santé publique de mettre en place les mesures de prévention individuelle et collective autour des cas, et le cas échéant, de déclencher des investigations pour identifier l'origine de la contamination et agir pour la réduire.

Les données transmises concernent la personne elle-même tels que son âge, son sexe, son lieu de domicile, sa profession lorsqu'il peut y avoir un lien avec la maladie. Elles concernent aussi la maladie comme la nature des symptômes, les résultats des analyses de dépistage réalisées, les circonstances d'acquisition de la maladie. Enfin, des informations sur les traitements ou les mesures préventives prises pour la personne atteinte et son entourage, sont recueillies selon les maladies.

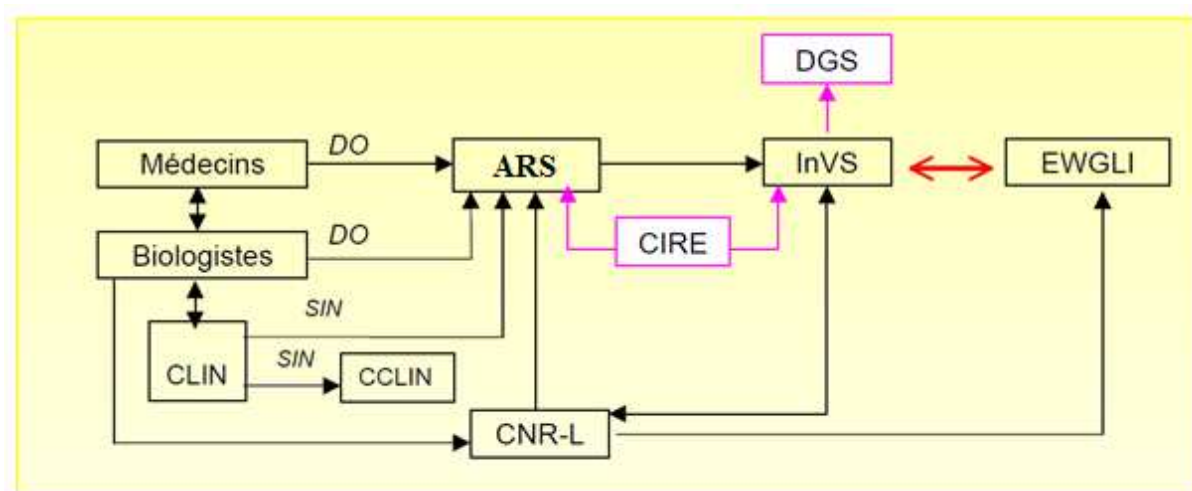
Le médecin ou le biologiste transmet ces données au médecin inspecteur de santé publique de l'ARS qui lui-même les transmet, après vérification, à l'Institut de veille sanitaire (InVS).

La notification intervient après le signalement et après confirmation du diagnostic. Les médecins ou les biologistes déclarant notifient le cas au médecin inspecteur de santé publique de l'ARS du lieu d'exercice au moyen d'une fiche spécifique (voir ci-dessous) à la légionellose. La notification permet de détecter les cas groupés et les épidémies, d'analyser et de suivre l'évolution de ces maladies au sein de la population afin de mieux cibler les actions de prévention locales et nationales.

Les critères de signalement et de notification sont les suivants :

- cas probable : pneumopathie avec titre d'anticorps élevé (≥ 256)
- cas confirmé : pneumopathie avec
- isolement de *Legionella* spp. dans un prélèvement clinique
- ou augmentation du titre d'anticorps ($\times 4$) avec un 2^{ème} titre minimum de 128
- ou immunofluorescence directe positive
- ou présence d'antigène soluble urinaire.

L'organisation de la collecte des données des cas de légionellose en France est résumée dans le schéma ci-dessous.



(ARS = Agence Régionale de Santé ; DO = Déclaration Obligatoire ; CLIN = Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales ; SIN = Signalement des Infections Nosocomiales ; CCLIN = Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales ; CNR-L = Centre National de Référence des *Legionella* ; CIRE = Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie ; DGS = Direction Générale de la Santé ; InVS = Institut de Veille Sanitaire ; EWGLI = European Working Group for *Legionella* Infections).

Figure A1-68 : Surveillance de la légionellose en France.

ANNEXE II : NORME NF T90-431 « RECHERCHE ET DENOMBREMENT DE *LEGIONELLA* SPP ET DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* »

Cette norme décrit une méthode pour la recherche et le dénombrement de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* dans les eaux propres (eaux destinées à la consommation humaine, eaux chaudes sanitaires, eaux minérales naturelles, etc.) et dans les eaux sales (eaux industrielles, eaux naturelles, etc.).

La méthode préconisée par la norme pour la recherche des *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* se déroule en plusieurs étapes successives schématisées ci-après.

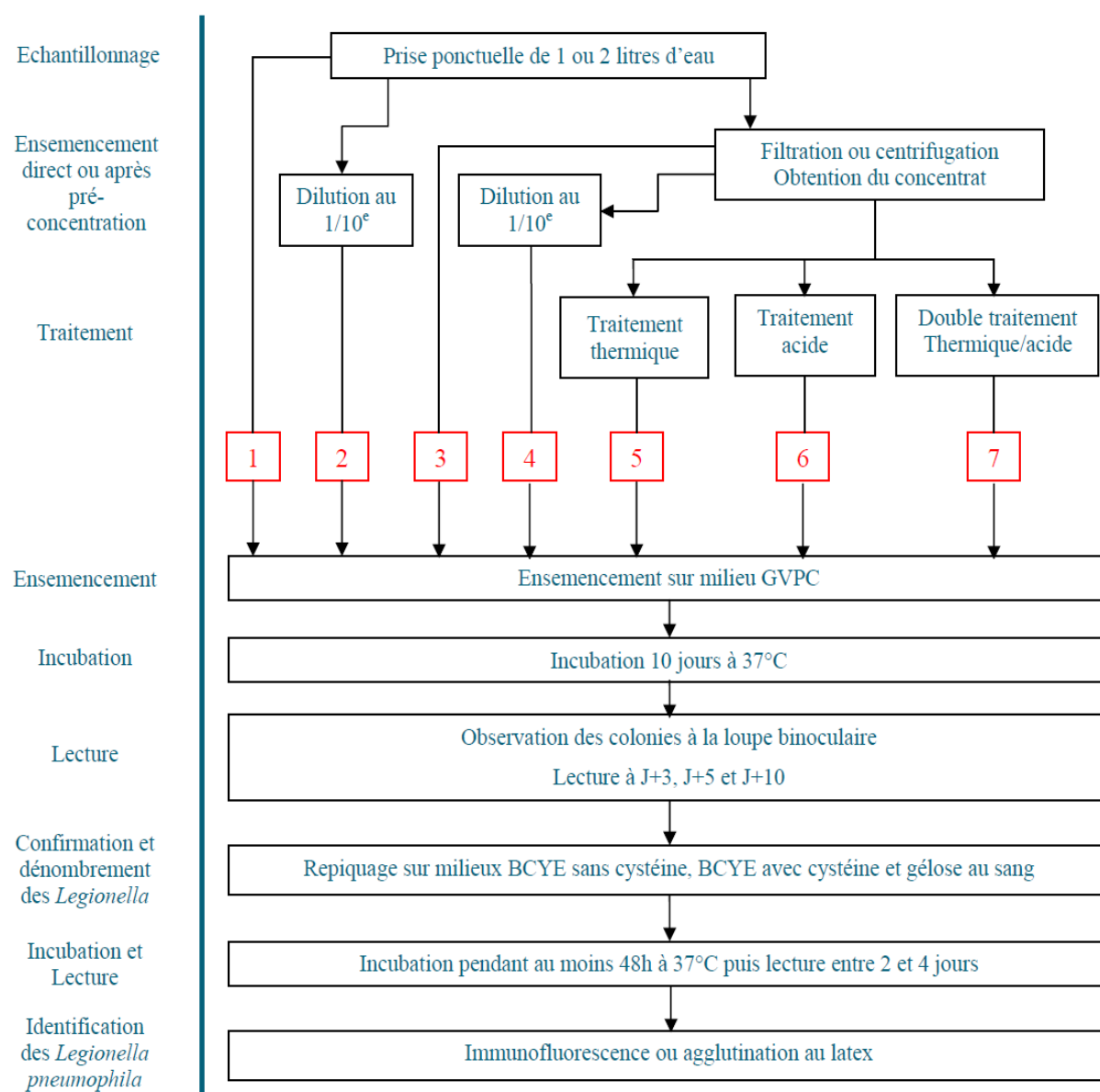


Figure A2-69 : Etapes de recherche et de dénombrement des *L. spp.* et *L. pneumophila* selon la norme NF T90-431.

Le prélèvement doit être effectué dans un récipient stérile. Dans le cas où les échantillons proviennent d'eaux traitées par du chlore, du brome ou de l'ozone, le récipient collecteur doit contenir du thiosulfate de sodium pour neutraliser les oxydants.

Le transport des échantillons doit se faire à température ambiante s'il est inférieur à 24 heures ou dans une enceinte réfrigérée à $5 \pm 3^\circ\text{C}$ si la durée du transport est supérieure à 24 heures.

Ensemencement direct:

1 Ensemencement échantillon brut : permet la détection des *Legionella* en forte concentration

2 Ensemencement après dilution au $1/10^e$: permet la détection des *Legionella* en très forte concentration, préconisé pour les eaux sales afin de diluer la flore autre que *Legionella*.

Pré-concentration :

La pré-concentration est une étape permettant de concentrer les particules en suspension dans un petit volume d'eau. Elle permet la détection des *Legionella* en faible concentration dans l'échantillon. Il existe deux techniques proposées par la norme pour réaliser la pré-concentration : la filtration pour les eaux propres ou la centrifugation pour les eaux sales ou non filtrables.

Le concentrât ainsi obtenu peut être ensemencé directement **3** ou après une dilution au $1/10^e$ **4**.

Le concentrât peut également subir un traitement avant son ensemencement.

Traitement :

Le traitement physique (thermique) ou chimique (acide) permet l'élimination d'une grande partie de la flore annexe et la sélection des *Legionella*.

Deux traitements sont préconisés pour toutes les eaux : le traitement thermique **5** et le traitement acide **6**.

Pour les eaux sales, un traitement supplémentaire doit être réalisé : le traitement thermique/acide **7**.

Ensemencement :

L'ensemencement est réalisé sur un milieu spécifique et sélectif pour *Legionella* : le milieu GVPC (Glycine – Vancomycine – Polymyxine – Cycloheximide). Ce milieu comprend des antibiotiques inhibiteurs de la flore annexe, de l'extrait de levure qui représente la source de Carbone, du charbon actif qui est un détoxifiant, de la L-Cystéine et du fer qui sont des facteurs de croissance indispensable pour les *Legionella*.



Figure A2-70 : Ensemencement d'un échantillon d'eau sur un milieu GVPC.

Incubation :

L'incubation des milieux de culture se fait dans une étuve thermostatée à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 8 à 10 jours. L'optimum de croissance des *Legionella* est à 36°C .

Lecture :

La lecture des boîtes GVPC consiste à repérer et à compter les colonies caractéristiques du genre *Legionella* à l'œil nu et à la loupe binoculaire. Pour chaque boîte, trois lectures au minimum sont à réaliser entre J+3 et J+10.

A l'œil nu, les colonies apparaissent rondes, de coloration gris bleu et pouvant devenir blanchâtres en vieillissant.



Figure A2-71: Observation à l'œil nu de colonies de *Legionella* cultivée sur GVPC.

A la loupe binoculaire, les colonies ont un bord net et un aspect de verre frité. Leur coloration est rose à verte.

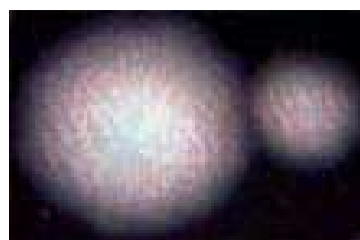


Figure A2-72: Observation à la loupe binoculaire de colonies de *Legionella* cultivée sur GVPC.

Confirmation et dénombrement des *Legionella* :

Cette étape consiste à repiquer des colonies caractéristiques repérées après lecture issues des boîtes GVPC sur trois milieux solides différents :

- BCYE sans L-cystéine (absence du facteur de croissance)
- Gélose au sang (gélose nutritive pour la majorité des bactéries mais absence du facteur de croissance pour *Legionella*)
- BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) avec L-cystéine (présence du facteur de croissance).

Incubation et lecture:

Les boîtes sont incubées au moins 48 heures à $36 \pm 2^\circ\text{C}$. La présence de *Legionella* est confirmée que s'il y a développement de bactéries sur les milieux contenant le facteur de croissance.

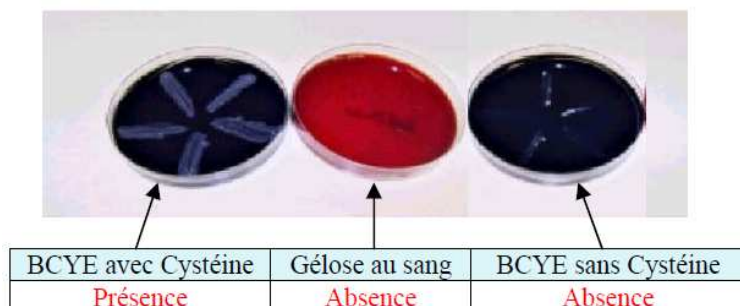


Figure A2-73 : Confirmation du genre *Legionella* selon la norme NF T90-431.

Sont donc considérées comme *Legionella* toutes les colonies présentant un aspect caractéristique et ne cultivant que sur le milieu BCYE avec Cystéine.

Identification des *Legionella pneumophila* :

Chaque colonie identifiée comme *Legionella* subit un test immunologique pour déterminer si ces colonies appartiennent à l'espèce *Legionella pneumophila*. Ce test est réalisé en utilisant des anticorps anti-*Legionella pneumophila*. Deux techniques sont possibles : le test d'immunofluorescence directe (IFD) ou le test d'agglutination au latex.

Le test d'immunofluorescence directe correspond à un marquage fluorescent des *Legionella pneumophila* à l'aide d'anticorps monoclonaux reconnaissant tous les sérogroupes des *Legionella pneumophila*.

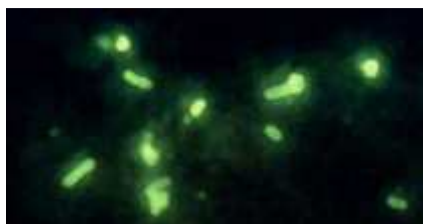


Figure A2-74 : Test d'immunofluorescence directe.

Le test d'agglutination au latex consiste à mettre la bactérie en présence d'anticorps anti-*Legionella pneumophila* fixés sur un support inerte, le latex. Si la bactérie est de l'espèce *Legionella pneumophila*, ses antigènes vont réagir avec les anticorps, on assiste à une agglutination visible à l'œil nu. Ce test permet également de déterminer le séro groupe des *Legionella pneumophila*.

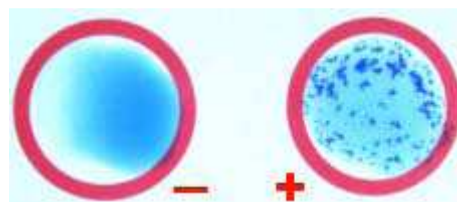


Figure A2-75 : Test d'agglutination au latex.

ANNEXE III : ARRETE DU 13 DECEMBRE 2004 RELATIF AUX INSTALLATIONS DE REFROIDISSEMENT PAR DISPERSION D'EAU DANS UN FLUX D'AIR SOUMISES A AUTORISATION AU TITRE DE LA RUBRIQUE N°2921

Le présent arrêté fixe les prescriptions applicables de plein droit aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation préfectorale au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées.

Sont considérés comme faisant partie de l'installation de refroidissement au sens du présent arrêté l'ensemble des éléments suivants : tour(s) de refroidissement et ses parties internes, échangeur(s), l'ensemble composant le circuit d'eau en contact avec l'air (bac[s], canalisation[s], pompe[s]...) ainsi que le circuit d'eau d'appoint et le circuit de purge.

Les prescriptions concernent les points suivants:

- implantation – aménagement ;
- conception ;
- surveillance de l'exploitation ;
- entretien préventif, nettoyage et désinfection de l'installation ;
- dispositions en cas d'impossibilité d'arrêt annuel pour le nettoyage et la désinfection de l'installation ;
- surveillance de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection ;
- actions à mener en cas de prolifération de légionelles ;
- mesures supplémentaires en cas de découverte de cas de légionellose ;
- carnet de suivi ;
- bilan périodique ;
- contrôle par un organisme agréé ;
- dispositions relatives à la protection des personnels ;
- prévention de la pollution des eaux.

En fonction du type d'installation et de sa puissance thermique, les tours sont soumises soit à déclaration soit à autorisation et doivent respecter les prescriptions fixées par :

- l'Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation au titre de la rubrique n° 2921 ;
- l'Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à déclaration sous la rubrique n° 2921 Installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air ;
- Circulaire du 8 décembre 2005 relative à l'application des arrêtés ministériels du 13 décembre 2004 relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air ;
- Arrêté du 7 juin 2006 portant agrément des organismes pour le contrôle des installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air.

QUELQUES TYPES DE TOURS AEROREFRIGERANTES

Schéma d'une tour à circuit dit "ouvert" : l'eau à refroidir est directement pulvérisée dans un flux d'air.

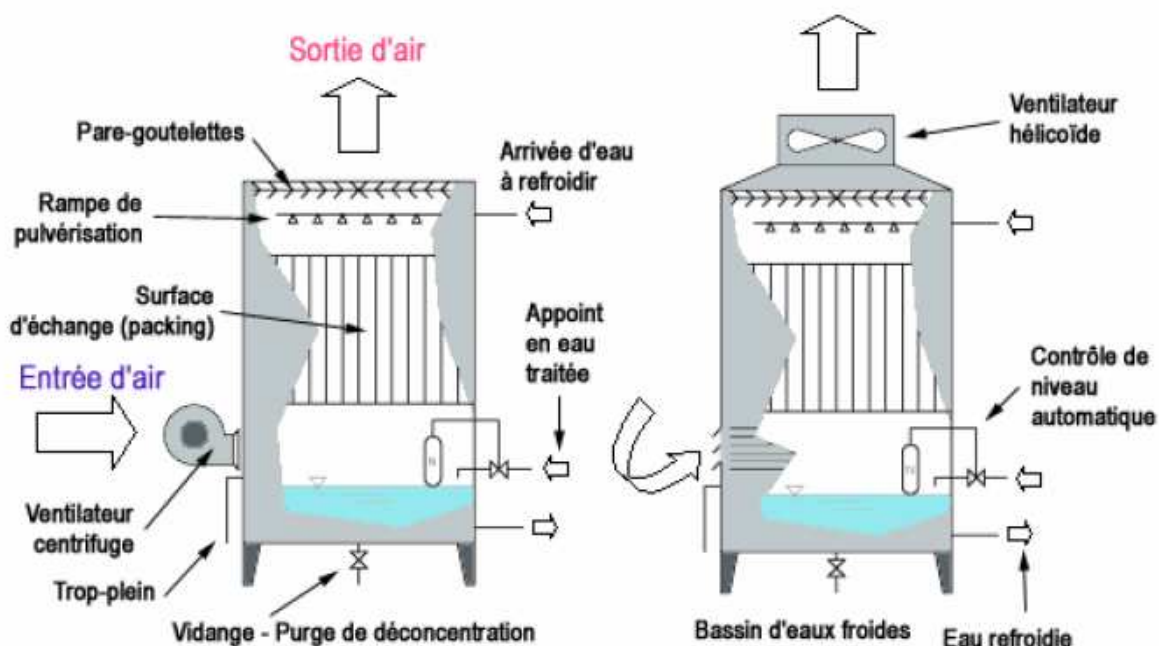


Figure A3-76: Schéma d'une tour à circuit de refroidissement dit "ouvert".

Schéma d'une tour à circuit dit "fermé" : l'eau à refroidir passe dans un système d'échange sec (tubes par exemple). Ce système est arrosé par de l'eau d'un circuit annexe permettant un refroidissement par évaporation.

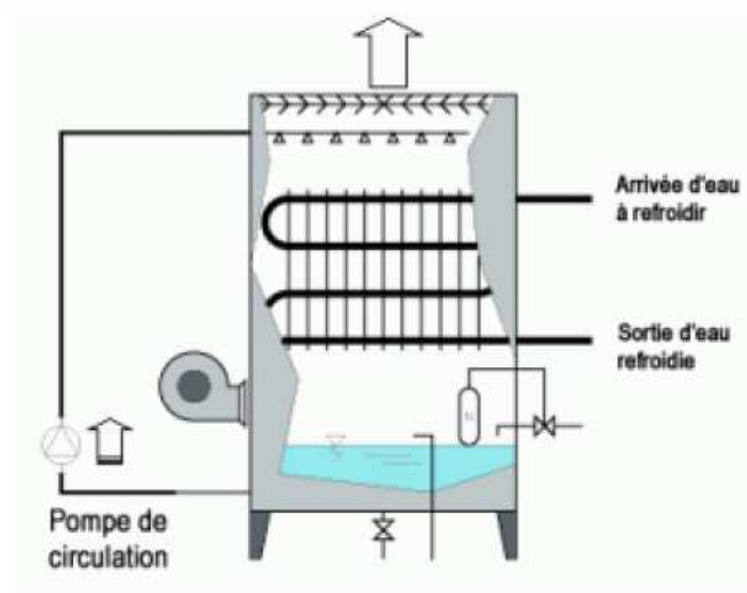


Figure A3-77: Schéma d'une tour à circuit de refroidissement dit "fermé".

Sur ces schémas, le flux d'air est dans les deux cas susceptible d'entraîner des gouttelettes d'eau hors de la tour, et donc des légionelles, si l'eau en est contaminée.

ANNEXE IV : INSTALLATION DE REFROIDISSEMENT PAR DISPERSION D'EAU DANS UN FLUX D'AIR. EXEMPLE D'UNE TOUR AEROREFRIGERANTE A CONTRE-COURANT D'UN CIRCUIT DE REFROIDISSEMENT D'UNE CENTRALE NUCLEAIRE

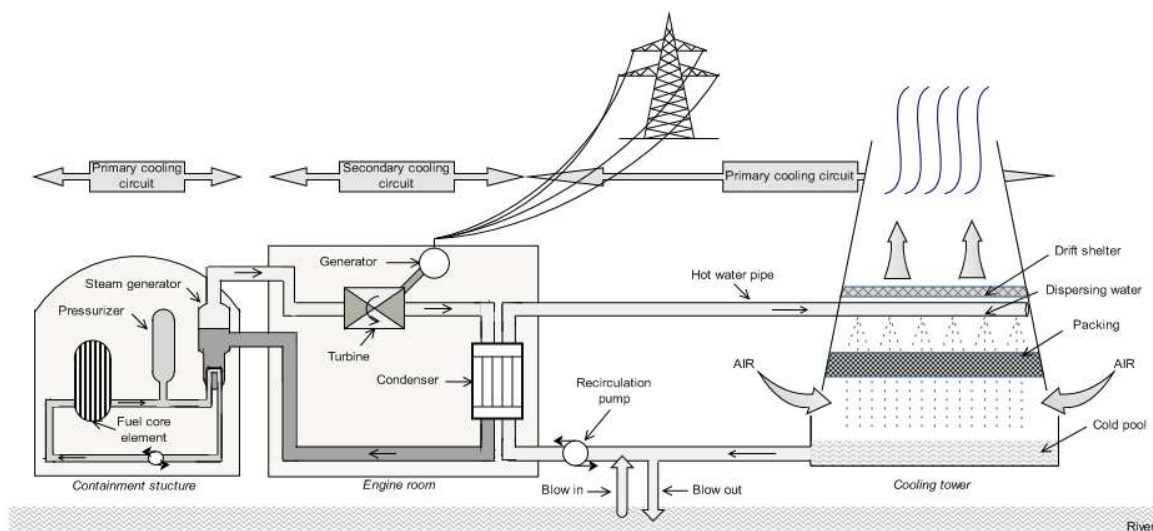


Figure A4-78: Schéma général du fonctionnement du système de refroidissement d'une centrale nucléaire.

FONCTIONNEMENT D'UNE CENTRALE NUCLEAIRE

Dans une tranche nucléaire, de l'eau sous pression est chargée de récupérer la chaleur produite par la fission de l'uranium. Cette eau alors sous forme de vapeur, se transforme en énergie mécanique au moyen d'une turbine à vapeur. L'alternateur utilise ensuite cette énergie mécanique pour produire de l'électricité. Les réacteurs utilisant cette technologie sont appelés Réacteurs à Eau Pressurisée (REP), 80% des centrales nucléaires en Europe utilisent ce type de réacteur. Il existe d'autres types de réacteurs comme les réacteurs à eau lourde pressurisée, les réacteurs avancés au gaz, ou encore les réacteurs à eau bouillante.

Pour récupérer de l'énergie mécanique à partir de chaleur, une source chaude et une source froide sont nécessaires. Ces sources sont matérialisées par trois circuits d'eau indépendants qui assurent les échanges de chaleur :

- dans le réacteur, la fission de l'uranium produit une grande quantité de chaleur. Cette chaleur chauffe de l'eau jusqu'à 300°C. Cette eau est maintenue sous forme liquide par une forte pression (155 bar), elle constitue le circuit primaire d'une centrale nucléaire.
- la chaleur de l'eau du circuit primaire est échangée avec l'eau du circuit secondaire via des générateurs de vapeur. L'eau du circuit secondaire subit des cycles de vaporisation / condensation permettant de produire de l'électricité par un alternateur. En effet, la vapeur issue de l'échange thermique entre le circuit primaire et secondaire fait tourner une turbine couplée à un alternateur ce qui produit de l'électricité. Cette vapeur est ensuite transformée en liquide dans le condenseur afin de recommencer un cycle de production d'électricité.

- dans le condenseur, l'eau du circuit secondaire sous forme de vapeur cède son excédant thermique à l'eau du circuit tertiaire. Le circuit tertiaire, appelé aussi circuit de refroidissement (CRF) permet donc la continuité du cycle vapeur / liquide de l'eau du circuit secondaire. L'eau du circuit tertiaire peut-être elle-même refroidie par contact avec l'air dans une tour aéroréfrigérante avant d'être réutilisée pour refroidir le circuit secondaire.

CIRCUIT DE REFROIDISSEMENT DES CENTRALES NUCLEAIRES

Le cœur du circuit de refroidissement est composé du condenseur qui permet la condensation de la vapeur de l'eau du circuit secondaire. Ce condenseur, de type tubulaire (environ 100 000 tubes par condenseurs), permet l'échange thermique entre la vapeur du circuit secondaire et l'eau du circuit tertiaire.

L'eau du circuit tertiaire provient d'une source extérieure qui est la rivière ou la mer selon la localisation géographique de la centrale. L'eau prélevée dans cet environnement est appelée eau d'appoint, elle ne subit aucun traitement d'élimination des matières en suspension (MES) ou de décarbonatation avant son entrée dans le circuit. Le débit de l'eau entrant dans le circuit est d'environ 2 m³/s pour les centrales en bord de rivière, il est plus important pour les centrales en bord de mer car l'eau ne re-circule pas dans le circuit.

Dans le condenseur, au contact de la vapeur du circuit secondaire, l'eau du circuit tertiaire subit une augmentation de température. Cette eau chaude transite à la sortie du condenseur dans un bassin appelé bassin chaud. De la vapeur d'eau issue de cette eau chaude est entraînée dans l'atmosphère. Cette vapeur d'eau visible à l'œil nu, le panache, se dégage de la tour aéroréfrigérante, avec un débit d'environ 0.7 m³/s.

L'eau du bassin chaud est ensuite pulvérisée sur le packing. Le packing est la surface d'échange sur laquelle se produit l'échange thermique eau / air. L'eau ainsi refroidie est récupérée dans un second bassin appelé bassin froid.

Un séparateur de gouttes est installé en sortie d'air de la TAR. Ce pare gouttelettes est conçu pour retenir l'entraînement vésiculaire. L'entraînement vésiculaire correspond aux fines particules d'eau entraînées dans l'atmosphère par la circulation de l'air dans la tour.

Une purge est associée à ce circuit, elle permet le renouvellement de l'eau du circuit tertiaire et évite les phénomènes de surconcentration des éléments chimiques de l'eau. Le débit de la purge est de 1.3 m³/s.

ANNEXE V : REGLEMENTATION DES INSTALLATIONS NUCLEAIRES DE BASE

Les activités nucléaires sont définies par l'article L. 1333-1 du code de la santé publique. Elles sont soumises, en tant qu'activités nucléaires, à diverses dispositions spécifiques ayant pour but la protection des personnes et de l'environnement.

Les Installations Nucléaires de Base (INB) sont régies par le décret 2007-1557 du 2 Novembre 2007. Le texte réglementaire qui encadre la gestion du risque lié à la présence de légionelles des tours aéroréfrigérantes des CNPE, est l'arrêté RTGE du 31 Décembre 1999 modifié le 31 Janvier 2006. Cet arrêté fixe la réglementation technique générale destinée à prévenir et limiter les nuisances et les risques externes résultant de l'exploitation des installations nucléaires de base.

Enfin, la DGS, la Direction de la prévention des pollutions et des risques (DPPR), la Direction des relations au travail (DRT) et l'ASN, par la circulaire n°DGS/DPPR/DGSNR/DRT/2006/213 du 15 Mai 2006, ont conjointement défini l'organisation à mettre en place afin de gérer au mieux la survenue d'une situation de cas groupés de légionellose autour d'installations dotées de tours aéroréfrigérantes, quel que soit le secteur d'activité concerné.

Par ailleurs, la loi du 13 Juin 2006 relative à la transparence et à la sécurité en matière nucléaire (dite loi «TSN» n°2006-686) donne à l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN) la compétence pour «prendre des décisions réglementaires à caractère technique pour compléter les modalités d'application des décrets et arrêtés pris en matière de sûreté nucléaire».

La loi TSN définit différentes notions relatives aux INB :

- La sécurité nucléaire est un concept global regroupant « *la sûreté nucléaire, la radioprotection, la prévention et la lutte contre les actes de malveillance, ainsi que les actions de sécurité civile en cas d'accident* ».
- La sûreté nucléaire est « *l'ensemble des dispositions techniques et des mesures d'organisation relatives à la conception, à la construction, au fonctionnement, à l'arrêt et au démantèlement des installations nucléaires de base, ainsi qu'au transport des substances radioactives, prises en vue de prévenir les accidents ou d'en limiter les effets* ».
- La radioprotection est « *la protection contre les rayonnements ionisants, c'est-à-dire l'ensemble des règles, des procédures et des moyens de prévention et de surveillance visant à empêcher ou à réduire les effets nocifs des rayonnements ionisants produits sur les personnes, directement ou indirectement, y compris par les atteintes portées à l'environnement* ».
- La transparence en matière nucléaire est « *l'ensemble des dispositions prises pour garantir le droit du public à une information fiable et accessible en matière de sécurité nucléaire* ».

Les INB sont en outre soumises, pour leur conception, leur construction, leur fonctionnement et leur démantèlement, à des règles techniques de deux types :

- les règles techniques générales applicables à toutes les INB ou à certaines catégories d'entre elles (par exemple, les réacteurs électronucléaires de puissance ou « REP ») ;

ces règles sont définies par des arrêtés des ministres chargés de la sûreté nucléaire et des décisions à caractère réglementaire prises par l'ASN et approuvées par les ministres ; ces textes d'application obligatoire peuvent être complétés par des guides de l'ASN à caractère indicatif ;

- les règles individuelles définies spécifiquement pour chaque INB ; elles sont fixées dans les décrets autorisant la création ou le démantèlement d'une INB et dans des décisions particulières de l'ASN; ces prescriptions de l'ASN sont directement applicables, sauf celles qui fixent les limites de rejets de l'INB qui doivent être homologuées par les ministres chargés de la sûreté nucléaire.

Concernant les légionelles et les INB, en l'état des connaissances, l'ASN considère que, compte tenu de leur complexité et de leur taille, si un circuit est contaminé, il l'est de manière définitive et le risque existe. Les traitements curatifs n'auront donc qu'un impact temporaire, et nécessiteront donc d'être reconduits de façon régulière.

Pour renforcer la prévention du risque de légionellose, l'ASN, en liaison avec la Direction générale de la santé (DGS), a fixé à EDF, par lettre en date du 28 Janvier 2005, les niveaux de concentration en légionelles dans les circuits de refroidissement des centrales nucléaires à ne pas dépasser, ainsi que les exigences en matière de surveillance des installations.

Il a été tenu compte, pour déterminer ces niveaux, des résultats d'études d'EDF qui montrent que les grandes tours aéroréfrigérantes génèrent, pour une même concentration de légionelles dans les circuits, des concentrations dans l'environnement plus faibles que les tours communément rencontrées dans l'industrie ou le secteur tertiaire.

Ainsi, les niveaux de concentration en légionelles à ne pas dépasser dans les circuits de refroidissement des circuits secondaires ont été fixés à 5.10^6 UFC/L pour les centrales nucléaires munies de tours aéroréfrigérantes de grande taille (150 m de hauteur environ) et à 5.10^5 UFC/L pour la centrale de Chinon (tours de 28 m de hauteur). Les fréquences d'analyse sont adaptées aux concentrations mesurées.

Table A5-14: Fréquence de prélèvement à mettre en œuvre en fonction de la concentration en légionelles mesurée.

Concentration dans les circuits (Chinon compris) UFC/L	Périodicité des mesures
$C > 10^5$	Quotidienne
$10^4 < C \leq 10^5$	Hebdomadaire
$10^3 < C \leq 10^4$	Toutes les 2 semaines
$C \leq 10^3$	Mensuelles

ANNEXE VI : POLYMERASE CHAIN REACTION

La Polymerase Chain Reaction ou Amplification en Chaîne par Polymérase est une technique de réplcation ciblée de l'ADN *in vitro*. Cette technique permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN à partir d'un échantillon faiblement concentré. La quantité d'ADN obtenue est alors suffisante pour réaliser d'autres expériences.

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles faisant varier la température.

La conformation de l'ADN est initialement en double brin, puis une première étape ① de chauffage ($\sim 95^{\circ}\text{C}$) permet de séparer les 2 brins d'ADN complémentaires. Cette étape est appelée phase de dénaturation.

Une seconde étape ②, phase d'hybridation, réalisée entre 56 et 64°C permet d'hybrider les amorces par complémentarité avec l'ADN. Les amorces sont de courtes séquences nucléotidiques permettant le démarrage de la synthèse du nouveau brin d'ADN.

Enfin, lors de la phase d'élongation à 72°C ③, une enzyme, la polymérase, synthétise le brin complémentaire de l'ADN à partir des amorces en appariant les oligonucléotides libres dans le milieu réactionnel (les dNTPs) correspondant à la séquence de l'ADN.

Suite à la PCR, les fragments d'ADN ont été amplifiés 2^n fois, n étant le nombre de cycle de la PCR.

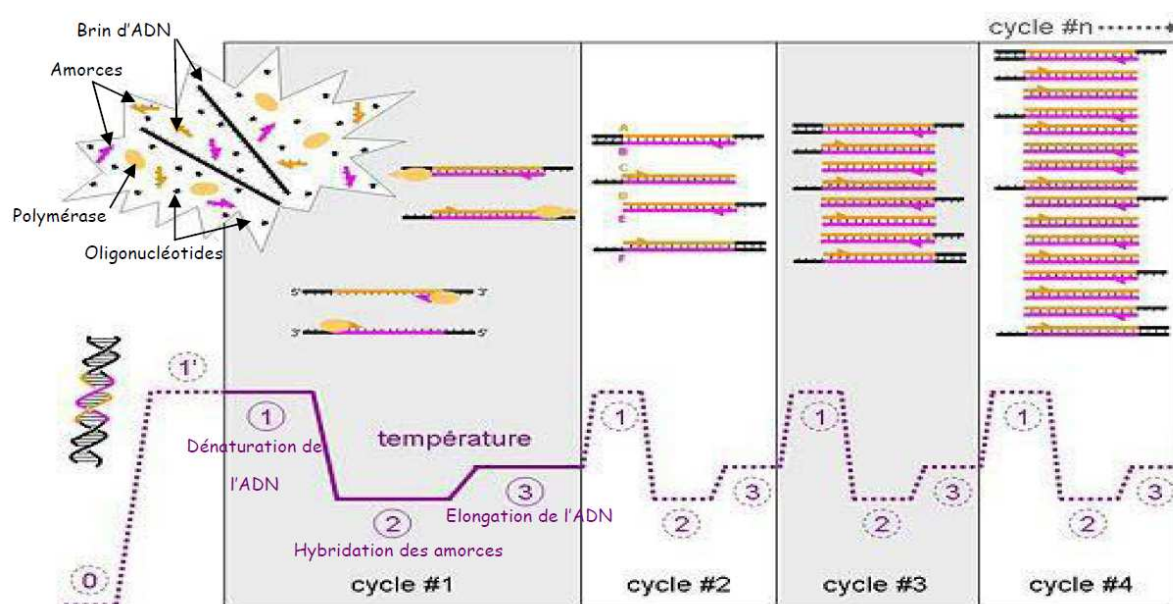


Figure A6-79: Schématisation des étapes de la PCR.

ANNEXE VII : BIAIS DUS A L'EXTRACTION DE L'ADN ET A LA PCR

BIAIS DUS A L'EXTRACTION DU MATERIEL GENETIQUE

La diversité d'une communauté est mesurée par la richesse et la distribution des populations au sein de cette communauté. Ces deux paramètres sont estimés par le nombre de séquences génétiques spécifiques des populations découvertes dans l'échantillon et leur fréquence relative. Cependant, la validité de l'estimation de la diversité basée sur l'analyse des métagénomes dépend de la représentativité du matériel génétique extrait (Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008; Rajendhran et Gunasekaran, 2010). La qualité et la quantité de l'ADN métagénomique ou de l'ARN influence la structure microbienne observée (Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008; Rajendhran et Gunasekaran, 2010).

L'efficacité de récupération du matériel génétique est influencée par divers paramètres.

Les méthodes de lyse bactérienne sont pour la plupart une combinaison de dégradation par voie chimique et physique. Les bactéries ont des sensibilités différentes aux agents de lyse selon le type de parois qu'elles possèdent (Theron et Cloete, 2000; Malik *et al.*, 2008). En effet, les bactéries Gram négatif, qui possèdent une couche de peptidoglycane plus fine que les bactéries Gram positif, sont plus sensibles à la lyse. Une lyse bactérienne insuffisante entraîne donc un taux de récupération de l'ADN ou de l'ARN des bactéries Gram négatif supérieur à celui des bactéries Gram positif. L'ADN ou l'ARN extrait est donc représentatif des bactéries à Gram négatif mais sous-estime la quantité de bactéries Gram + dans l'échantillon. La mesure de la biodiversité est ainsi biaisée avec une sous-estimation des bactéries Gram + et une aberration dans les proportions observées.

La quantité et la qualité de l'ADN ou ARN extrait sont aussi influencées par le type d'échantillon étudié. Pendant la lyse bactérienne, le matériel génétique libéré peut être adsorbé sur des particules présentes dans l'échantillon et ne pas être extrait par la suite (Theron et Cloete, 2000).

Ces phénomènes qui peuvent avoir lieu pendant la lyse bactérienne et l'extraction du matériel génétique ont des conséquences non négligeables sur l'estimation de la diversité. Si les étapes de lyse et d'extraction ne sont pas correctes, la diversité est sous-estimée et les proportions entre les populations ne sont pas respectées (Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008; Rajendhran et Gunasekaran, 2010).

La lyse et l'extraction de l'ADN sont aussi déterminantes pour le bon déroulement de l'amplification du matériel génétique par PCR.

BIAIS DUS A L'AMPLIFICATION PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE - PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification de l'ADN. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une enzyme, la Taq polymérase qui copie la séquence d'ADN. L'amplification de l'ADN par la polymérase n'est possible que si des amorces (courtes séquences oligonucléotidiques de synthèse) se fixent sur l'ADN et permettent l'initiation de la synthèse du nouveau brin d'ADN.

L'objectif de la PCR est de copier fidèlement et en très grand nombre toutes les séquences d'intérêt de manière uniforme, c'est à dire en respectant leur proportion.

De nombreux phénomènes peuvent biaiser l'amplification de l'ADN par la PCR.

Tout d'abord, certains biais de la PCR sont intrinsèques à la nature même de l'enzyme utilisée. La Taq polymérase est une enzyme qui peut faire des erreurs en copiant l'ADN. Bien que la fréquence d'erreur de l'enzyme soit faible, ce phénomène peut aboutir à de mauvaise identification des populations (Theron et Cloete, 2000; Acinas *et al.*, 2005; Spiegelman *et al.*, 2005). Il est conseillé de choisir une Taq polymérase haute fidélité.

La polymérase est une enzyme qui amplifie de manière sélective les séquences les plus abondantes dans l'échantillon (Wilson, 1997; Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005). Ce phénomène n'est pas maîtrisable lors de l'amplification. Il aboutit à l'amplification des séquences appartenant aux populations dominantes. Pour la mesure de la diversité il est donc important de noter que les populations rares ne sont pas détectées.

La polymérase est également sensible aux conditions de réaction. La présence de certaines substances peut inhiber son activité et diminuer l'efficacité de l'amplification. Le résultat de cette inhibition se manifeste par des proportions entre les séquences d'ADN amplifiées non représentatives de l'échantillon initial. Les substances inhibitrices de l'enzyme sont entre autres, les acides humiques, les composés organiques, les polysaccharides... Toutes ces substances sont naturellement présentes dans l'échantillon initial et co-extraites avec l'ADN (Wilson, 1997; Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008). Une purification de l'ADN adaptée au type d'échantillon est donc indispensable avant l'amplification.

Les biais de la PCR sont également dus à la nature de l'ADN amplifié. La PCR est une méthode durant laquelle se succèdent des cycles de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces et d'élongation de l'ADN. La dénaturation de l'ADN est réalisée par augmentation de la température. La température nécessaire pour dénaturer totalement un brin d'ADN est fonction de la composition en base du fragment. Pour les brins riches en bases GC, une température plus haute est nécessaire. Ainsi, la dénaturation est plus efficace pour les séquences riches en bases AT. La conséquence de ce phénomène est une amplification préférentielle des fragments riches en AT (Theron et Cloete, 2000; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008). Les proportions entre fragments d'ADN observées après l'amplification ne sont pas représentatives des proportions réelles. Il est important de tester les conditions réactionnelles de la PCR avant de réaliser les mesures de la biodiversité afin d'éviter ce phénomène.

De plus, des chimères d'ADN peuvent se former pendant la PCR (Theron et Cloete, 2000; Acinas *et al.*, 2005; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008; Rajendhran et Gunasekaran, 2010). Les chimères d'ADN correspondent à la recombinaison de fragments d'ADN sauvages proches. La séquence des deux fragments sauvages étant proche, ils forment par complémentarité un brin d'ADN chimère qui ne correspond à aucune population bactérienne. Ces brins chimères entraînent la sur-estimation de la diversité par la détection de faux positifs.

Ce phénomène peut également être observé pour les amorces. Des dimères d'amorces peuvent se former et biaiser la mesure de la diversité (Theron et Cloete, 2000; Acinas *et al.*, 2005; Spiegelman *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2008; Rajendhran et Gunasekaran, 2010).

ANNEXE VIII : LE BIOFILM

Le biofilm correspond à une matrice composée de substance vivante et non vivante fixée sur un support. Les micro-organismes attachés à la surface et attachés les uns aux autres produisent une matrice adhésive et protectrice appelée glycocalyx constituée d'exopolysaccharides. Les biofilms constituent un environnement hétérogène avec divers gradients d'oxygène, de nutriment, de polymère...

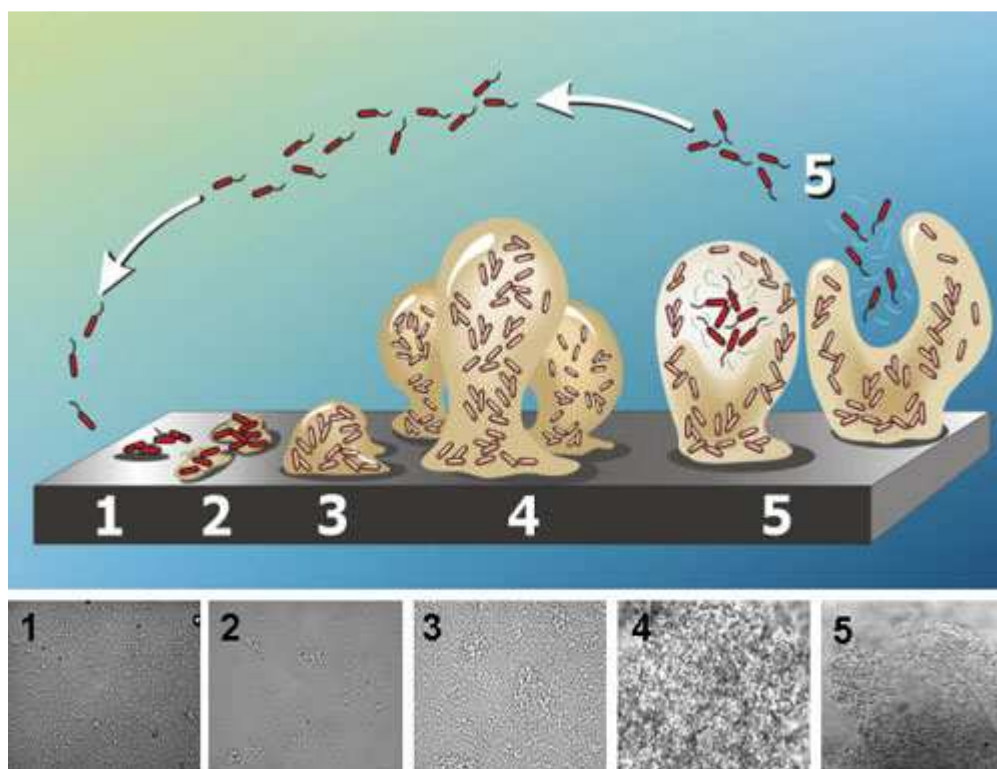


Figure A8-80: Cycle de vie d'un biofilm (d'après Cogan et Keener, 2004).

Les étapes de la vie d'un biofilm sont les suivantes:

1. La première étape est l'adhésion (réversible) de micro-organismes mobiles à une surface, principalement par des liaisons chimiques non covalentes ou faibles.
2. Puis vient l'étape d'adhésion permanente par la sécrétion de protéines appelées ligands, et la formation de structures telles que les pili. Ces premiers points fixes augmentent la capacité d'ancrage d'autres micro-organismes en accroissant et en variant les surfaces d'ancrage. Noter que certaines espèces ne sont pas capables de s'ancrer elles-mêmes et s'intègrent à d'autres espèces déjà installées en s'attachant à leur biofilm.
3. Les micro-organismes se multiplient, et commencent à former des micro-colonies. À partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les micro-colonies sécrètent la matrice d'exopolysaccharides.
4. Le biofilm grandit et mûrit, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique.
5. La cinquième étape est la phase de dispersion, dite phase planctonique : les micro-organismes quittent le biofilm et retournent à l'état planctonique.

En raison de leurs propriétés physiques uniques, les biofilms peuvent être résistants aux agents antimicrobiens. La formation de biofilms peut conduire à la contamination ou la corrosion des équipements.

ANNEXE IX : LES BARRIERES A LA PENETRATION DU BIOCIDES

Pour qu'un biocide atteigne sa cible cellulaire il doit en général être capable de traverser la membrane externe de la cellule. Les membranes, selon leur nature et leurs compositions, peuvent agir comme des barrières plus ou moins perméables et limiter le taux de biocide pénétrant dans la cellule.

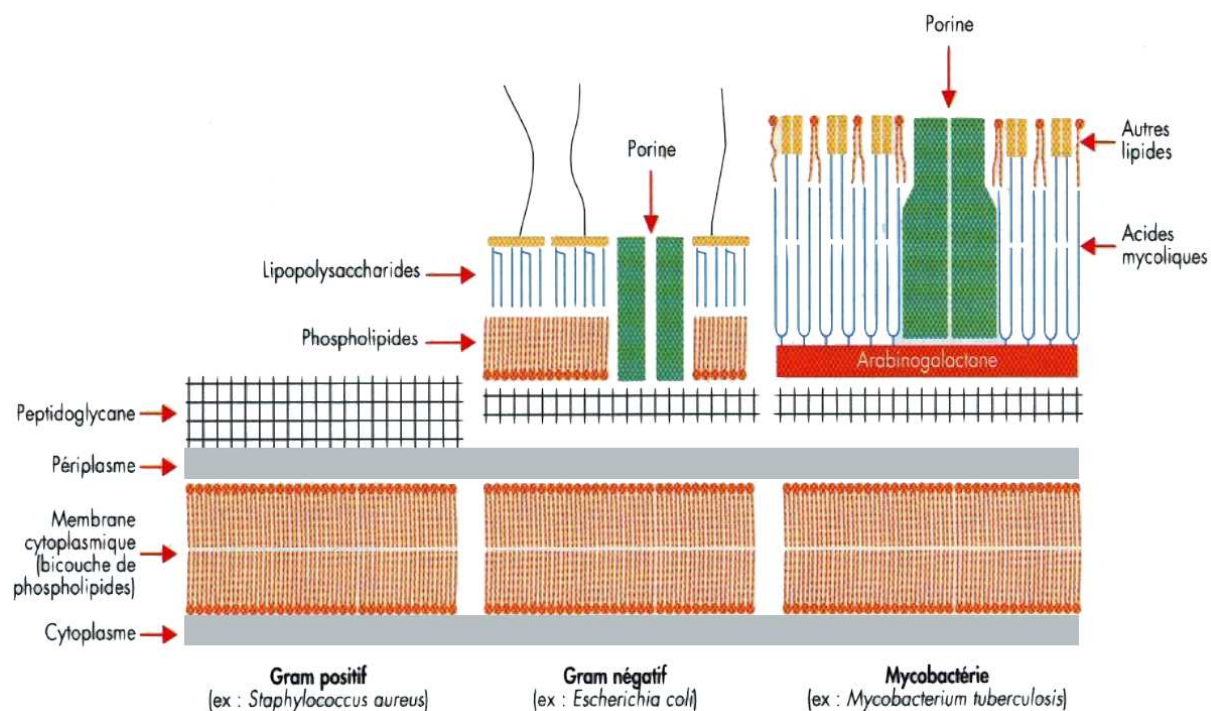


Figure A9-81: Structure des membranes des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des mycobactéries.

Les spores bactériennes de *Bacillus* ou *Clostridium* sont invariablement les plus résistantes aux biocides de toutes les bactéries. Les multiples membranes internes et externes des spores bactériennes limitent l'incorporation des agents biocide. Selon les bactéries et les biocides, l'acquisition de la résistance peut apparaître à différents stades de la sporulation (Russell, 1995; Tumah, 2009).

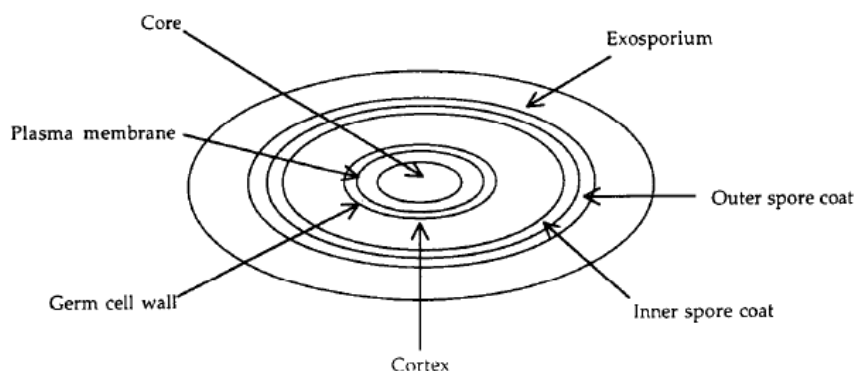


Figure A9-82: Schéma d'une spore bactérienne "typique" (d'après Russell, 1995).

ANNEXE X : RESISTANCE BACTERIENNE PAR SYSTEMES D'EFFLUX

Les bactéries sont capables d'éliminer des composés (antibiotiques, biocide...) par pompage actif qui rejette les composés toxiques hors de la cellule.

Ce système actif d'efflux est l'un des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques du pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, avec la perméabilité de la membrane externe et l'inactivation enzymatique (Nakae *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2001).

Pseudomonas aeruginosa produit constitutivement un nombre important de systèmes d'efflux spécifique : MexAB-OprM et MexXY-OprM. Ces pompes exportent à l'extérieur de la cellule des antibiotiques, des colorants, des détergents, des inhibiteurs, des désinfectants et des solvants organiques (Li *et al.*, 1995).

Des systèmes homologues sont présents chez *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia cepacia* (Poole, 2001).

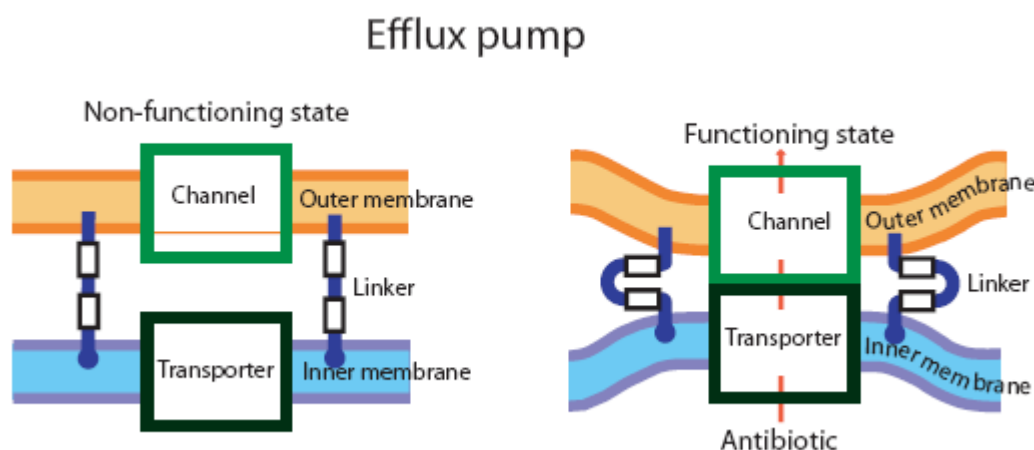


Figure A10-83: Pompes à efflux des bactéries à Gram négatif.

La pompe est composée d'un transporteur dans la membrane interne, d'un canal protéique dans la membrane externe et d'une protéine « linker » dans le périplasme. Quand la pompe est active le « linker » joint le transporteur et le canal permettant l'efflux à travers les deux membranes à partir du cytosol (Figure A10-83) (Normark et Normark, 2002).

Ces systèmes d'efflux sont présents chez la plupart des bactéries mais, au contraire de *Pseudomonas aeruginosa*, ne leur confèrent de résistance particulière qu'en cas de sur-expression liée à une mutation. Ces systèmes de résistance par efflux peuvent donc être des systèmes de résistance intrinsèque (ou inné) ou peuvent être le résultat d'une mutation ou de l'acquisition de gènes de résistances exogènes (Poole, 2005).

Chez les bactéries à Gram positif les systèmes d'efflux sont codés en majorité sur un plasmide. Chez les bactéries à Gram négatif les systèmes d'efflux sont des transporteurs multiples codés généralement sur l'ADN chromosomique (Paulsen *et al.*, 1993).

La mise en place de mécanismes d'efflux est à l'origine de résistances bactériennes aux ammoniums quaternaires (QAC), au triclosan, aux biguanides, à la chlorhexidine, la diamine, aux ions Ag+... (Poole, 2005). L'ensemble des systèmes d'efflux (gènes, protéines, biocides) connus à ce jour sont présentés dans le tableau suivant.

Table A10-15: Mécanismes d'efflux des bactéries résistantes aux biocides (d'après Poole, 2005).

Efflux determinant	Biocide ^a	Organism
Gram-positive		
QacA	QAC, DA, BG	<i>S. aureus</i>
QacB	QAC	<i>S. aureus</i>
QacC (also known as Smr, QacD, Ebr)	QAC	<i>S. aureus</i>
		coagulase-negative staphylococci
		<i>E. faecalis</i>
QacEΔ1	QAC	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>
QacG	QAC	<i>S. aureus</i>
QacH	QAC	<i>S. aureus</i>
QacJ	QAC	<i>Staphylococcus</i> spp.
MdeA	QAC	<i>S. aureus</i>
NorA	QAC, CTM	<i>S. aureus</i>
NorB	CTM	<i>S. aureus</i>
MepA	CHX, DA, QAC	<i>S. aureus</i>
?	QAC	<i>S. aureus</i>
Gram-negative		
QacE	QAC	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
QacEΔ1	QAC	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>H. pylori</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, <i>S. marcescens</i> , <i>Vibrio</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>E. cloacae</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Aeromonas</i> spp., <i>P. stuartii</i> , <i>M. morganii</i> , <i>P. vulgaris</i>
QacF	QAC	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i>
QacG	QAC	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. salmonicida</i>
CepA	CHX	<i>K. pneumoniae</i>
EmeA	BAC	<i>E. faecalis</i>
EmrE	BAC	<i>E. coli</i>
EvgA	QAC	<i>E. coli</i>
MdfA	BAC	<i>E. coli</i>
NorM	BAC	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>
PmpM	BAC	<i>P. aeruginosa</i>
SugE	QAC	<i>E. coli</i>
YhiUV-TolC	BAC	<i>E. coli</i>
AcrAB-TolC	QAC, PHN (incl. TRI)	<i>E. coli</i>
AcrAB-TolC	TRI	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium
CmeABC	CTM, TRI	<i>C. jejuni</i>
CmeDEF	CTM, TRI	<i>C. jejuni</i>
MexAB-OprM	TRI	<i>P. aeruginosa</i>
MexCD-OprJ	TRI	<i>P. aeruginosa</i>
MexEF-OprN	TRI	<i>P. aeruginosa</i>
MexJK	TRI	<i>P. aeruginosa</i>
SdeXY	BAC, CHX, TRI	<i>S. marcescens</i>
SmeDEF	TRI	<i>S. maltophilia</i>
SilABC	Ag ⁺	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, <i>Salmonella</i> sp., <i>S. marcescens</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (incl. O157:H7)
SilP	Ag ⁺	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium

^a BAC= benzalkonium chloride; BG = biguanides; CTM = cetrimide; CHX = chlorhexidine; DA = diamidine; QAC = quaternary ammonium compounds; PHN = phenolics; TRI = triclosan.

Les mécanismes d'efflux retrouvé chez les bactéries résistantes aux QAC et aux ions argent sont détaillés ci-après.

La résistance bactérienne aux Ammoniums quaternaires (QAC)

De nombreuses résistances aux QAC par système d'efflux ont été publiées chez les bactéries Gram+, particulièrement les *Staphylococcus* spp. Chez *Staphylococcus aureus*, le gène *qacA* code pour une pompe à efflux proton-dépendante liée à la membrane. Cette pompe n'est pas spécifique et transporte hors de la cellule d'autres cations organiques comme les biguanides... Chez *Staphylococcus aureus* le plasmide pSK01 qui porte *qacA* porte les gènes de résistances à la trimethoprim (*drfA*) et aux aminoglycosides (*aacA-aacD*) (Paulsen *et al.*, 1998). Les gènes de résistance aux biocides et aux antibiotiques peuvent être associés sur des éléments génétiques mobiles. La grande majorité des *Staphylococcus aureus* résistantes aux biocides porte le gène *qacA* (Russell, 2001).

La résistance bactérienne aux ions Ag⁺

Les bactéries *Pseudomonas stutzeri*, *Salmonella thyphimurium*, des membres des *Enterobacteriaceae* et *Citrobacter* spp peuvent être résistantes aux sels d'argent (Ag⁺). La résistance à l'argent est codée par un plasmide. Le plasmide pMG101, isolé chez *Salmonella thyphimurium* code la résistance à l'argent. Ce plasmide est transférable et code également pour la résistance au mercure, tellurite, ampicilline, chloramphénicol, tétracycline, streptomycine et sulphonamide (Larkin Mchugh *et al.*, 1975). Les gènes conférant la résistance à l'argent codent pour un système d'efflux constitué de deux types de pompes spécifiques des ions argent ainsi que des protéines périplasmiques capables de fixer les ions Ag⁺ (Silver, 2003).

ANNEXE XI : RESISTANCE BACTERIENNE PAR INACTIVATION DU BIOCIIDE

Ce mécanisme intervient chez des souches bactériennes qui synthétisent une enzyme modifiant ou clivant la molécule, la rendant inactive.

Il a été particulièrement étudié chez de nombreuses souches résistantes aux antibiotiques, notamment aux β -lactamines qui implique les enzymes β -lactamases, mais également chez *Pseudomonas fluorescens* qui peut être résistante aux biocides QAC en les dégradant via un processus de N-dealkylation (Nishihara *et al.*, 2000).

Le système de résistance par dégradation de l'agent bactéricide peut être un mécanisme inné ou peut être le résultat d'une acquisition de gènes de résistances exogènes (Poole, 2005).

Ces mécanismes, chez les bactéries à Gram négatif sont majoritairement intrinsèques et rarement portés par le plasmide hormis pour les résistances bactériennes aux ions argent, mercure et au formaldéhyde. Ces résistances impliquent des mécanismes de dégradation du biocide ou d'efflux. Les résistances aux biocides par acquisition plasmidique de systèmes d'efflux sont plus largement répandues chez les bactéries à Gram positif.

La résistance bactérienne au Mercure

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas* spp peuvent être résistantes au mercure et aux organomercurels. Le gène de cette résistance est porté par un plasmide inducible qui peut être transféré par conjugaison ou transduction. Cette résistance est spécifique de *Staphylococcus aureus* qui contient le plasmide de la pénicillinase. Le gène de résistance code pour des réductases et hydrolases (Russell, 2001). La réductase réduit les ions Hg^{2+} en vapeur monoatomique Hg^0 . La résistance aux organomercurels requière une hydrolase qui rompt la liaison C-Hg, les ions Hg^{2+} résultant sont alors réduits par la réductase et rendus volatiles (Schottel, 1977).

La résistance bactérienne au formaldéhyde

Les bactéries à Gram- et particulièrement les *Enterobacteriaceae* (dont *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*) et *Pseudomonas* spp peuvent être résistantes au formaldéhyde. Le gène conférant cette résistance à la bactérie est retrouvé sur l'ADN plasmidique. Il code pour l'enzyme GSH-FDH « glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenases ». Cette enzyme dégrade le formaldéhyde lorsqu'il est utilisé comme désinfectant (Kummerle *et al.*, 1996; Dorsey et Actis, 2004).

ANNEXE XII : LES QUATRE CNPE LOCALISES SUR LA LOIRE

Le bassin de la Loire, avec quatre centrales nucléaires exploitant l'eau de la rivière, constitue un lieu privilégié pour étudier la dynamique des populations de légionelles. Longue de 1 013 km, la Loire représente un bassin de 117 000 km² et présente un débit annuel moyen de 931 m³/s. Sur ce fleuve, quatre CNPE se succèdent :

- le CNPE de Belleville-sur-Loire est le premier site nucléaire rencontré sur la Loire. Il est localisé à, approximativement, 385 km de la source et possède deux tranches nucléaires de 1300 MW chacune. Aucun traitement biocide n'est employé sur ce site ;
- le CNPE de Dampierre-en-Burly est localisé à environ 37 km du CNPE de Belleville-sur-Loire. Il est constitué de quatre tranches nucléaires de 900 MW chacune, dont deux sont traitées en continu à la monochloramine entre Mai et Septembre ;
- le CNPE de Saint-Laurent-des-Eaux est à 98 km du précédent CNPE. Il est constitué de deux tranches nucléaires de 900 MW chacune. Ce site a fait l'objet d'une désinfection de l'eau du CRF de la tranche nucléaire n°1 à la monochloramine sur une période de deux mois environ, à partir du 30 Juillet jusqu'au 25 Septembre 2010. Le biocide était injecté à une concentration de 0.2 ± 0.05 mg/L ;
- le CNPE de Chinon est la dernière centrale nucléaire rencontrée sur la Loire. Elle est localisée à environ 130 km en aval du CNPE de St Laurent. Ce CNPE est constitué de quatre tranches nucléaires équipées de petites TAR. Chaque tranche nucléaire possède une puissance de 900 MW. Les CRF du CNPE de Chinon sont traités toute l'année à la monochloramine avec une concentration de 0.25 ± 0.05 mg/L.

Les caractéristiques des CRF des quatre CNPE de la Loire sont synthétisées dans le tableau ci-dessous.

Table A12-16:Caractéristiques des CRF des quatre CNPE de la Loire.

	Belleville-sur-Loire	Dampierre-en-Burly	St-Laurent-des-Eaux	Chinon
Type de condenseur	Laiton	Laiton	Mixte (Inox + Titane ou Laiton)	Acier inoxydable
Type de TAR ^a	Contre courant à tirage naturel	Contre courant à tirage naturel	Courant croisé à tirage naturel	Courant croisé à tirage forcé
Volume total du circuit	30 000 m ³	36 000 m ³	25 000 m ³	20 000 m ³
Débit de l'eau de circulation ^b	46.5 m ³ /s	34.5 m ³ /s	33 m ³ /s	33 m ³ /s
Débit d'eau d'appoint ^b	2 m ³ /s	1.53 m ³ /s	1.45 m ³ /s	1.45 m ³ /s
Débit d'évaporation ^b	0.75 m ³ /s	0.51 m ³ /s	0.4 à 0.7 m ³ /s	0.5 m ³ /s
Débit de purge ^b	1.25 m ³ /s	1.02 m ³ /s	0.85 m ³ /s	0.95 m ³ /s
Temps de séjour des matières circulantes	6.5 h	9.8 h	10 h	7 h
Temps de circulation	10.45 min	17.40 min	12.37 min	10.10 min
Facteur de concentration	1.6	1.5	1.7	1.5
Traitement à la monochloramine	NON	OUI	OUI	OUI
Nombre de tranche traitée	/	2	2	4
Période de traitement	/	De Mai à Septembre	De Mai à Septembre	En continu, à l'année
Finalité du traitement	/	Anti-amibe Anti-légionelle	Anti-amibe Anti-légionelle	Anti-légionelle

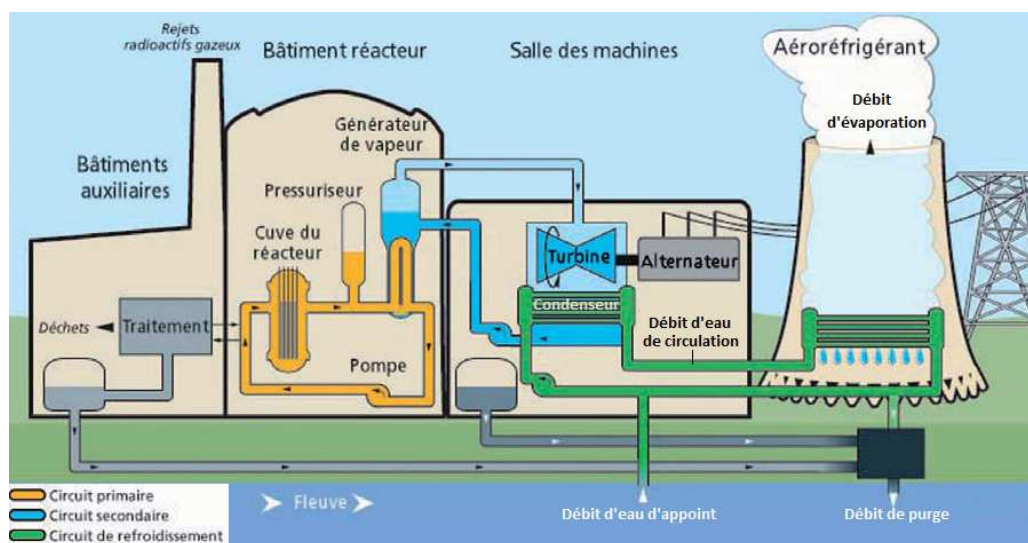
^a voir Figure 2-55^b voir schéma suivant

Figure A12-84: Structure d'une centrale nucléaire et point de mesure des débits du CRF.

ANNEXE XIII : MESURE DE LA BIODIVERSITE

En 1992, la Convention sur la Diversité Biologique (CDB), traité international signé par plus de 170 pays dont la France, définit la biodiversité comme étant la « *variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes* » (United-Nations, 1992).

La biodiversité est donc un terme regroupant trois composantes principales : la diversité au sein des espèces (intraspécifique), entre les espèces (interspécifique) et des écosystèmes (écosystémique) qui correspondent aux interactions entre les populations vivantes et leurs environnements physiques (Costello, 2000). En écologie, on mesure généralement la biodiversité d'un échantillon par le nombre d'espèces présentes (richesse spécifique) et par la distribution de ces espèces au sein de l'écosystème (équité ou « *eveness* ») qui représente la structure de la communauté (Figure A13-85) (Whittaker, 1965; Magurran, 1988; Torsvik *et al.*, 2002).

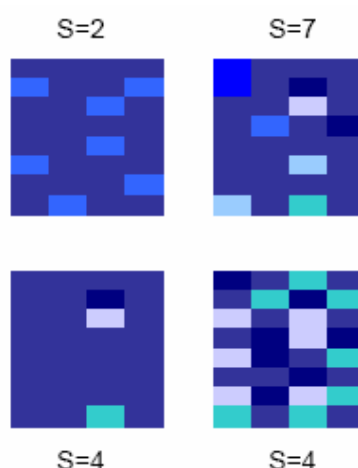


Figure A13-85: Importance de la richesse (en haut) et de l'équité (en bas) pour la définition de la diversité.

MESURE DE LA RICHESSE SPECIFIQUE

L'indice de richesse spécifique, le plus simple et le plus couramment utilisé est tout simplement le nombre d'espèces observées S_{obs} ou son logarithme $\ln(S_{obs})$.

En apparence très simple, cet indice pose le problème de la qualité de l'échantillonnage. En effet, dans un écosystème, un certain nombre d'espèces rares peuvent exister. La probabilité de détecter ou de ne pas détecter ces populations dépend de l'effort d'échantillonnage. Un effort d'échantillonnage minimal doit donc être respecté pour mesurer la richesse spécifique d'un écosystème.

Cependant, la probabilité de détecter la totalité des espèces présentes dans un écosystème étant faible, des méthodes d'estimation de la richesse spécifique ont été développées (Hurlbert, 1971; Peet, 1974).

Estimation graphique

Les courbes de raréfaction ont été élaborées par Sander, (1968) et permettent une estimation de la richesse spécifique en fonction du nombre d'individus échantillonnés (Heck *et al.*, 1975; Gotelli et Colwell, 2001; Colwell *et al.*, 2004). Cette méthode a été largement utilisée en écologie et permet une comparaison facile de plusieurs communautés (Hartmann et Widmer, 2006; Almeida *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011). Son principe est simple, la courbe représentant le nombre d'espèces en fonction du nombre d'individus identifiés est extrapolée jusqu'au plateau de la courbe correspondant à l'estimation de la richesse spécifique (Figure A13-86). L'estimation du nombre d'espèce par extrapolation de la courbe de raréfaction est réalisée selon la méthode de Michaelis-Menton et a été proposé par Raaijmakers (1987).

Cette méthode est utilisée pour déterminer l'effort d'échantillonnage nécessaire pour garantir une correcte estimation de la richesse spécifique (Aguilar *et al.*, 2011b; Ishak *et al.*).

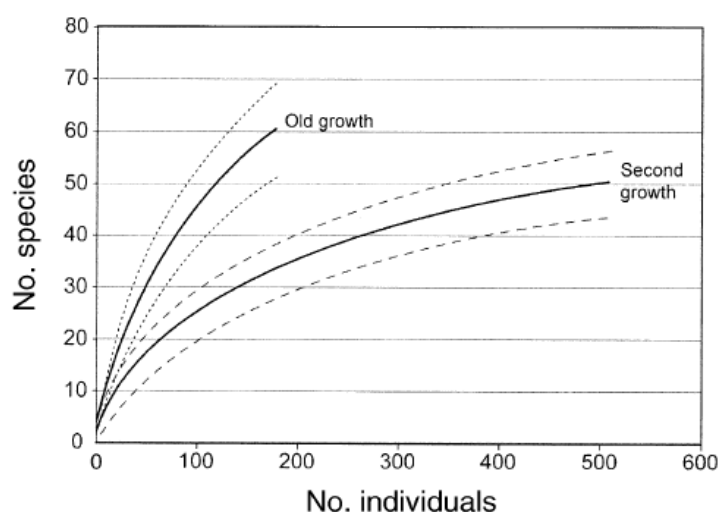


Figure A13-86: Courbes de raréfaction de différentes espèces d'arbres tropicaux (d'après Colwell *et al.*, 2004)

(Courbes en pointillés : intervalles de confiance à 95%).

L'extrapolation de chacune des courbes de raréfaction permet d'estimer la richesse spécifique de chaque échantillon et de comparer les deux communautés en se basant sur un même nombre d'individus.

Les courbes de dominance k ont été mises en point par Lambshead *et al.* (1983). Ces courbes permettent de comparer la richesse spécifique de plusieurs échantillons entre eux mais ne permettent pas d'estimer la richesse spécifique des communautés. Ces courbes présentent également l'avantage d'accéder rapidement à des notions de dominance et de rareté de certaines populations dans l'échantillon. Les courbes de dominance k sont obtenues en représentant graphiquement le pourcentage d'abondance cumulée par rapport au rang k de l'espèce sur une échelle logarithmique. Les courbes de dominance sont très peu utilisées en diversité bactérienne mais sont très répandue pour la description de communautés macroscopiques.

Estimation paramétrique

Ces analyses supposent que les distributions des espèces suivent des modèles statistiques. Ces modèles permettent de décrire la relation mathématique entre le nombre d'espèces et le nombre d'individus dans chaque espèce. Quatre modèles de distribution d'abondance des espèces ont été décrits (Figure A13-87) :

Modèle géométrique. Ce modèle a été développé par Motomura (1932). Dans ce modèle, une fraction k des ressources nutritives est consommée par l'espèce la plus abondante. La 2^{ème} espèce la plus abondante utilisera la même fraction k des ressources restantes pour son développement. Ainsi, si les abondances des espèces sont proportionnelles à leur part de la ressource, le classement des espèces en fonction de leur abondance est donné par une série géométrique. Ce modèle est peu observé dans la nature, il est caractéristique des communautés présentant une faible diversité (He et Tang, 2008).

Modèle logarithmique : ce modèle développé Fisher *et al.* (1943) est proche du modèle géométrique. Dans ce modèle sont considérés deux types de distribution d'abondance. Le nombre réel d'espèces présentes dans la communauté est supposé infini.

Modèle logarithmique normal : à partir d'un grand nombre de données échantillonnées, Preston (1948) émet l'hypothèse que l'abondance des espèces suit une distribution Gaussienne. De ce fait, il suppose que la majorité des espèces ont une abondance intermédiaire, que les espèces majoritaires et rares ne sont représentées que par une faible proportion d'espèces. Ce modèle a été utilisé par Godon *et al.* (1997) sur des communautés microbiennes de l'appareil digestif. Ils ont montré que dans cet écosystème, l'abondance des espèces bactériennes suit un modèle log-normal. Curtis a développé un estimateur de la richesse spécifique basée sur ce modèle (Curtis *et al.*, 2002).

Modèle « broken-stick » : développé par MacArthur (1957), ce modèle suppose que chaque espèce colonise la communauté simultanément. La répartition des ressources pour chacune des espèces étant aléatoire, leur abondance l'est aussi.

Les paramètres de la loi choisie pour estimer le nombre d'espèces présentes dans une communauté sont estimés par la méthode du maximum de vraisemblance à partir des données observées. L'ensemble des méthodes paramétriques présentent l'inconvénient de fournir des estimations très dépendantes de la loi choisie.

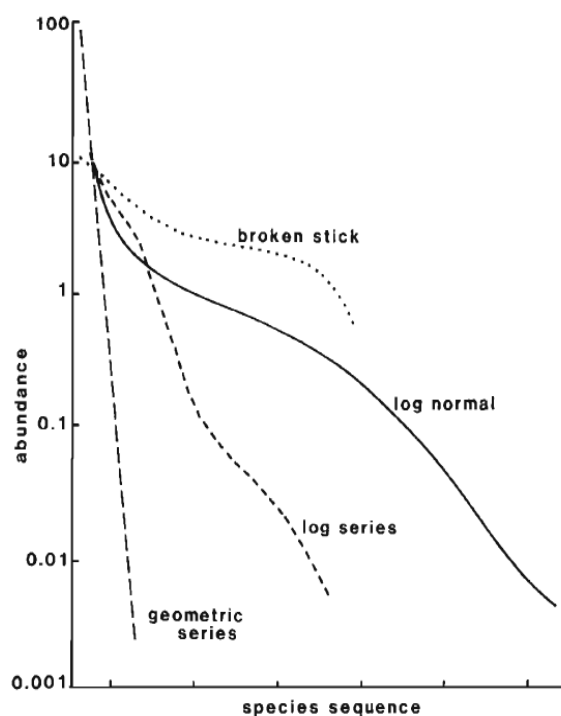


Figure A13-87: Modèles de distribution d'abondance des espèces au sein d'une communauté (d'après Magurran, 1988).

(En abscisse : les espèces classées par rang d'abondance, en ordonnée : l'abondance relative des espèces sur une échelle logarithmique.)

Dans les études de diversité, sont préférées les estimations non paramétriques aux estimateurs paramétriques.

Estimation non paramétrique

Les indices de diversité non paramétriques estiment la richesse spécifique à partir de la fréquence d'observation de chaque espèce.

Indice de Chao (1984) : cet indice estime le nombre d'espèces non observées à partir de celles observées 1 ou 2 fois, il est indépendant du nombre d'individus échantillonnés.

$$\hat{S}_{Chao1} = S_{obs} + \frac{(S_1)^2}{2S_2} \text{ si } S_2 > 0 \quad (\text{Chao, 1984})$$

$$\hat{S}_{Chao1} = S_{obs} + \frac{S_1(S_1-1)}{2} \text{ si } S_2 = 0 \quad (\text{Chao, 2005})$$

avec $\hat{S}_{Chao1}$ l'estimateur de la richesse spécifique
 S_{obs} le nombre d'espèces différentes observées
 S_1 le nombre d'espèces observées une fois
 S_2 le nombre d'espèces observées deux fois

Chao (1987) utilise une autre méthode pour obtenir un estimateur de la richesse spécifique, cette fois en prenant en corrigeant le nombre d'individus observés dans chaque espèce par le nombre n d'individus échantillonnés :

$$\hat{S}_{Chao2} = S_{obs} + \frac{(n-1)(S_1)^2}{2nS_2} \text{ si } S_2 > 0$$

$$\hat{S}_{Chao2} = S_{obs} + \frac{(n-1)S_1(S_1-1)}{2n} \text{ si } S_2 = 0$$

avec $\hat{S}_{Chao2}$ l'estimateur de la richesse spécifique
 S_{obs} le nombre d'espèces différentes observées
 S_1 le nombre d'espèces observées une fois
 S_2 le nombre d'espèces observées deux fois
 n le nombre d'individus échantillonnés

Estimateur ACE : Good (1953) définit le taux de couverture de l'échantillonnage (*sample coverage*) comme :

$$\hat{C} = 1 - \frac{S_1}{\sum_{i=1}^S iS_i}$$

avec $\hat{C}$ l'estimateur du taux de couverture de l'échantillonnage
 S_1 le nombre d'espèces observées une fois
et S_i le nombre d'espèces observées i fois dans l'échantillon

A partir de cet estimateur, Chao et Lee (1992) développent l'estimateur de la richesse spécifique ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*), en fonction de la fréquence d'observation des espèces rares et abondantes définies par le seuil κ (arbitrairement, les espèces rares sont définies comme celles étant observées 10 fois ou moins de 10 fois dans l'échantillon et les espèces abondantes sont celles observées plus de 10 fois). Cet estimateur

prend également en compte le coefficient de variation de la fréquence d'observation des espèces.

Ainsi :

$$\hat{S}_{ACE} = S_{>\kappa} + \frac{S_{\leq\kappa}}{\hat{C}_{\leq\kappa}} + \frac{S_1}{\hat{C}_{\leq\kappa}} \hat{\gamma}_{\leq\kappa}^2$$

avec $\hat{S}_{ACE}$ l'estimateur ACE

$S_{>\kappa}$ le nombre d'espèces abondantes observées plus de κ fois

$S_{\leq\kappa}$ le nombre d'espèces rares, observées κ fois ou moins

$\hat{C}_{\leq\kappa}$ le taux de couverture ne prenant en compte que les espèces rares

S_1 le nombre d'espèces observées une fois

S_i le nombre d'espèces observées i fois

$\hat{\gamma}_{\leq\kappa}^2$ l'estimateur du coefficient de variation ne prenant en compte que les espèces rares :

$$\hat{\gamma}_{\leq\kappa}^2 = \max \left(\frac{S_{\leq\kappa} \sum_{i=1}^{\kappa} i(i-1) S_i}{\hat{C}_{\leq\kappa} (\sum_{i=1}^{\kappa} i S_i) (\sum_{i=1}^{\kappa} S_i - 1)} - 1; 0 \right)$$

Lorsque l'hétérogénéité est très forte ($\hat{\gamma}_{\leq\kappa}^2$ supérieur à 0.8), un autre estimateur du coefficient de variation des espèces rares lui est préféré :

$$\tilde{\gamma}_{\leq\kappa}^2 = \max \left(\hat{\gamma}_{\leq\kappa}^2 \left(1 + \frac{(1 - \hat{C}_{\leq\kappa}) \sum_{i=1}^{\kappa} i(i-1) S_i}{\hat{C}_{\leq\kappa} (\sum_{i=1}^{\kappa} i S_i - 1)} \right); 0 \right)$$

L'estimateur ACE est dépendant de la valeur seuil κ , définissant arbitrairement la frontière entre les espèces rares et abondantes, il est normalement plus grand que l'indice de Chao.

Estimateur Jackknife : cet estimateur permet d'estimer la richesse spécifique d'une communauté en réduisant le biais de l'estimateur. Cette méthode de calcul, développée par Burnham et Overton (1979), permet d'obtenir une estimation du nombre d'espèces, appelés Jackknife à l'ordre j , en prenant en compte les valeurs de $\hat{S}_1$ à $\hat{S}_j$. Les estimateurs du 1^{er} et du 2^{ème} ordre sont les plus utilisés :

$$\hat{S}_{j1} = S_{obs} + \frac{(n-1)S_1}{n}$$

$$\hat{S}_{j2} = S_{obs} + \frac{(2n-3)S_1}{n} - \frac{(n-2)^2 S_2}{n(n-1)}$$

avec $\hat{S}_{j1}$ et $\hat{S}_{j2}$ les estimateurs Jackknife d'ordre 1 et 2

S_{obs} le nombre d'espèces différentes observées

S_1 le nombre d'espèces observées une fois

S_2 le nombre d'espèces observées deux fois

n le nombre d'individus échantillonnés

Performance des différentes méthodes d'estimation de la richesse spécifique

Globalement, trois méthodes d'estimation de la richesse spécifique ont été développées :

Estimation graphique : extrapolation de la courbe d'abondance cumulée des espèces selon la méthode Michaelis-Menton développée par Raaijmakers (1987) ;

Estimation paramétrique : détermination des paramètres des modèles de distribution d'abondance notamment du modèle log-normal par la méthode de Curtis *et al.* (2002) ;

Estimation non paramétrique : utilisation des lois de probabilité pour estimer le nombre d'espèces réelles sans présumer d'un modèle de distribution d'abondance.

L'ensemble de ces méthodes présentent des avantages et des inconvénients qu'il est important de considérer pour avoir une correcte interprétation des données.

L'estimation graphique est une méthode simple qui permet facilement la comparaison entre différents échantillons. Cependant, cette méthode suppose que toutes les espèces présentes dans l'échantillon représentatif de l'écosystème ont été détectées. Cette méthode sous-estime de la richesse réelle de l'échantillon (Shaw *et al.*, 2008).

L'estimation de la richesse spécifique par l'utilisation de modèles paramétriques est une méthode complexe qui implique des choix hypothétiques sur la distribution d'abondance des espèces. En effet, le choix du modèle utilisé repose sur des connaissances théoriques de l'écosystème étudié (Bohannon et Hughes, 2003).

Ainsi, Curtis *et al.* (2002) et Dunbar *et al.* (2002) supposent que la distribution d'abondance des espèces des écosystèmes microbiens correspondent au modèle log-normal. Selon les études, cette hypothèse est confirmée ou infirmée. Des analyses de données empiriques sur des communautés bactériennes de sol ont montré que le modèle théorique ne reflète pas la réelle distribution des espèces observée dans la nature (Dunbar *et al.*, 2002). Inversement, Curtis *et al.* (2006) analysent des données issues des travaux de Godon *et al.* (1997) sur des communautés d'archaea et de bactéries anaérobies issues de la distillation de vin. Selon cette étude, (i) bien qu'issues du même écosystème, les archaea et les bactéries ne présentent pas la même distribution d'abondance, (ii) les abondances des espèces bactériennes semblent suivre un modèle log-normal.

Outre les hypothèses à formuler pour choisir le modèle paramétrique, un nombre de données important est nécessaire pour déterminer les paramètres du modèle et estimer la richesse spécifique de l'échantillon (Bohannon et Hughes, 2003; Curtis *et al.*, 2006). De plus, les modèles paramétriques sont sensibles à la concentration bactérienne dans l'échantillon. Une forte différence dans la concentration entre différents prélèvements rend la comparaison de leur richesse spécifique difficile par les modèles paramétriques (Shaw *et al.*, 2008).

Les estimations non paramétriques sont les plus largement répandues en écologie microbienne. Elles permettent la détermination de la richesse spécifique à partir d'un petit échantillon sans présumer du modèle de distribution d'abondance des espèces présentes (Hughes *et al.*, 2001).

Ces estimateurs sont dépendants de l'effort d'échantillonnage (Walther et Morand, 1998). Le nombre d'espèces rares étant corrélé avec l'effort d'échantillonnage, une tendance à la sous-estimation peut être observée (Bohannon et Hughes, 2003) notamment pour les communautés où les micro-organismes sont répartis de manière inégale (Schloss et

Handelsman, 2005; Curtis *et al.*, 2006). Un effort d'échantillonnage minimal doit être respecté afin de garantir une correcte estimation de la richesse spécifique par ces estimateurs non paramétriques. Cependant, selon Foggo *et al.* (2003), l'ensemble des estimateurs non paramétriques permettent une bonne estimation de la richesse spécifique dans la mesure où l'effort d'échantillonnage effectué correspond, au minimum, à la moitié de l'effort d'échantillonnage nécessaire pour atteindre l'asymptote de la courbe d'abondance cumulée des espèces.

Les estimateurs non paramétriques sont basés sur des méthodes de calcul probabilistes. Il est possible pour chacun des estimateurs de calculer leur variance et leur erreur type. Les comparaisons statistiques de plusieurs échantillons sur la base de ces estimateurs sont donc facilement réalisables (Hughes *et al.*, 2001; Bohannan et Hughes, 2003).

L'estimateur ACE est basé sur une valeur seuil définissant la frontière entre les populations rares et abondantes. Cette valeur est fixée de manière arbitraire. La valeur de l'estimation de la richesse spécifique dépend de cette valeur et a donc un effet sur la performance de l'estimateur ACE (Gotelli et Colwell, 2001; Foggo *et al.*, 2003). Les estimateurs Chao et Jackknife présentent une meilleure robustesse (Walther et Morand, 1998).

Shaw *et al.* (2008) réalisent une comparaison de l'ensemble des ces estimateurs sur plusieurs communautés bactériennes issues de différents échantillons d'environnements aquatiques naturels (lacs, océans, baies). Ils montrent, comme Colwell et Coddington (1994), que les estimateurs non paramétriques ainsi que l'estimation graphique basée sur la méthode Michaelis-Menton, présentent une sous-estimation de la richesse réelle des échantillons. L'estimateur paramétrique basé sur le modèle log-normal de Curtis donne la plus forte estimation de la richesse spécifique (Figure A13-88).

Cette étude souligne également la forte corrélation entre l'ensemble de ces estimateurs excepté avec l'estimateur paramétrique (Shaw *et al.*, 2008) (Figure A13-89). Autrement dit, bien que la valeur estimée de la richesse soit différente selon l'estimateur utilisé, ils révèlent les mêmes différences de richesse entre les échantillons.

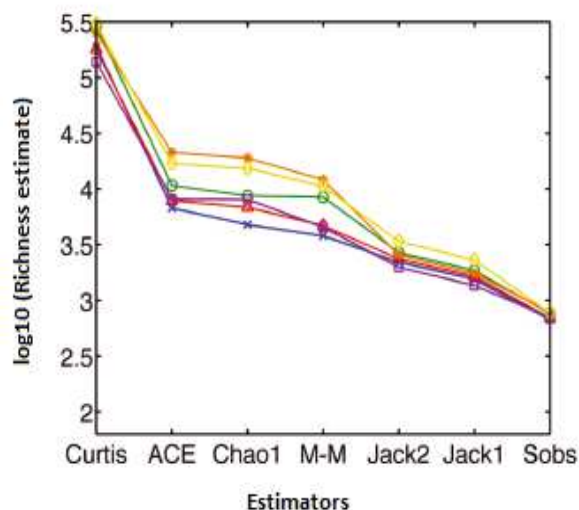


Figure A13-88: Comparaison de différents estimateurs (graphique, paramétrique, et non paramétrique) sur la valeur calculée de la richesse spécifique de communautés bactériennes d'échantillons d'eaux (d'après Shaw *et al.*, 2008).

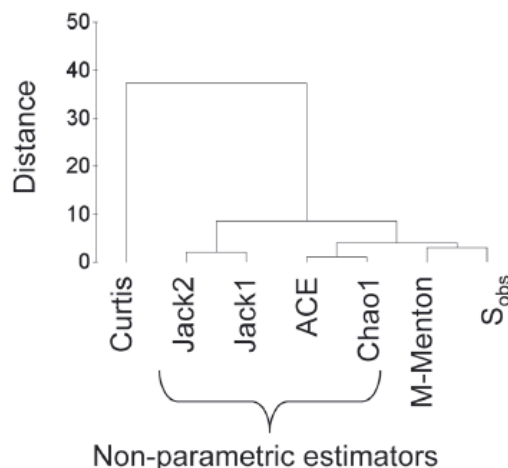


Figure A13-89: Représentation schématique (dendrogramme) de la similarité entre différents estimateurs (d'après Shaw *et al.*, 2008).

INDICE DE SHANNON

L'indice de Shannon permet d'estimer le degré de diversité d'un échantillon en tenant compte à la fois du nombre d'espèces présentes mais aussi de leur abondance dans l'échantillon. C'est donc un indice double qui permet d'obtenir des informations sur la richesse spécifique et sur la distribution des populations.

L'indice de diversité de Shannon (1948), aussi appelé indice de Shannon et Weaver (1949), a été défini par :

$$H = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} p_i \ln p_i$$

avec H l'estimateur de Shannon

S_{obs} le nombre d'espèces observées dans l'échantillon

p_i la proportion de l'espèce i par rapport au nombre d'individus échantillonnés n

Cet indice est minimal lorsque tous les individus échantillonnés appartiennent à la même espèce. Il est également minimal lorsque toutes les espèces ne sont représentées que par un seul individu. Inversement, il est maximal lorsque toutes les espèces sont représentées de manière équivalente. L'indice de Shannon est le plus populaire des indices de diversité, certains auteurs l'ont recommandé comme étant la meilleure expression de la diversité d'une communauté, associant richesse et équitabilité des populations (Gray *et al.*, 1990).

INDICE DE SIMPSON

L'indice de Simpson (1949), ou Gini-Simpson, mesure la probabilité que deux individus échantillonnés au hasard appartiennent à la même espèce.

Il est défini par :

$$D = \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i(n_i-1)}{n(n-1)}$$

avec S_{obs} le nombre d'espèces observées dans l'échantillon
 n_i le nombre d'individus appartenant à l'espèce i
 n le nombre d'individus échantillonnés

Cet indice a une valeur nulle pour indiquer le maximum de diversité (c'est-à-dire lorsque la probabilité que deux individus tirés au hasard appartiennent à la même espèce est faible) et une valeur de 1 pour indiquer le minimum de diversité (c'est-à-dire lorsque la probabilité que tous les individus appartiennent à la même espèce est forte). En pratique, dans le but d'obtenir des valeurs «plus intuitives», l'indice de diversité de Simpson, noté E , déterminé par $1-D$ est généralement préféré à l'indice de Simpson, D . Ainsi, le maximum de diversité est représenté par la valeur 1 et le minimum de diversité par la valeur nulle.

Cet indice, D est également considéré comme un indicateur de régularité (Morin, 2011) : pour un nombre d'espèces identiques, la valeur de l'indice augmente lorsque la dominance est importante.

MESURE DE L'ÉQUITABILITÉ

Une expression de la régularité est souvent donnée à partir de l'indice de Shannon (Lloyd et Ghelardi, 1964; Pielou, 1975). Cette indice, appelé indice de Pielou, correspond au rapport de la diversité observée (H) à une distribution des fréquences des espèces complètement égale (H_{max}) (Gray *et al.*, 1990).

La valeur maximale de l'indice de Shannon est obtenue quand la distribution des espèces est parfaitement régulière, alors $H_{max} = \ln S_{obs}$.

L'indice de Pielou s'exprime alors :

$$J = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln S_{obs}}$$

avec J l'indice d'équitabilité de Pielou
 H l'indice de diversité de Shannon
 H_{max} la valeur maximale de l'indice de Shannon
 S_{obs} le nombre d'espèces observées dans l'échantillon

J est compris entre 0 (une seule espèce présente dans l'échantillon) et 1 (toutes les espèces ont la même fréquence de distribution).

Les différentes approches de mesure de la diversité ne donnent finalement lieu qu'à trois mesures estimées de la diversité : l'estimation de la richesse spécifique, l'indice de Shannon, l'indice de Simpson et l'indice de l'équitabilité. L'estimation du nombre d'espèce (ou richesse spécifique) est la mesure qui donne le plus d'importance aux espèces rares. L'indice de Shannon donne la même importance à tous les individus. L'indice de Simpson donne, lui, plus d'importance aux espèces abondantes.

RESUME : *Ecologie des légionelles dans l'eau des circuits de refroidissement des centrales nucléaires en bord de Loire.*

Les circuits de refroidissement des centrales nucléaires en bord de rivière sélectionnent par leur mode de fonctionnement des micro-organismes à caractère thermophile, parmi lesquels le micro-organisme pathogène, *Legionella pneumophila*. Pour lutter contre le développement de ce genre bactérien, un traitement de désinfection de l'eau des circuits de refroidissement à la monochloramine peut être employé. Pour participer à la maîtrise des risques sanitaires et environnementaux liés à la modification physico-chimique et microbiologique de l'eau naturelle prélevée, EDF s'est engagé dans une démarche d'amélioration des connaissances sur l'écologie des légionelles dans les circuits de refroidissement et des liens que ce genre bactérien entretient avec son environnement (physico-chimique et microbiologique) favorisant ou non leur prolifération. Ainsi, la diversité et la dynamique des *Legionella pneumophila* cultivables ont été déterminées dans les quatre centrales nucléaires en bord de Loire pendant un an et leurs liens avec leur environnement physico-chimique et microbiologique ont été étudiés. Cette étude a mis en évidence une forte diversité des sous-populations de *Legionella pneumophila* et une apparente dynamique qui semble être liée à l'évolution d'un nombre restreint de sous-populations. Les sous-populations de légionelles semblent entretenir des relations souche-spécifiques avec les paramètres biotiques et présenter des sensibilités différentes aux variations physico-chimiques du milieu. La conception des circuits de refroidissement pourrait impacter la communauté de légionelles. L'utilisation de la monochloramine perturbe fortement l'écosystème mais ne sélectionne pas de populations tolérantes au biocide.

Mots-clés : *Legionella*, écologie, diversité, dynamique, biocide, monochloramine.

ABSTRACT: *Ecology of Legionella within water cooling circuits of nuclear power plants along the French Loire River.*

The cooling circuits of nuclear power plants, by their mode of operating, can select thermophilic microorganisms including the pathogenic organism *Legionella pneumophila*. To control the development of this genus, a disinfection treatment of water cooling systems with monochloramine can be used. To participate in the management of health and environmental risks associated with the physico-chemical and microbiological modification of water collected from the river, EDF is committed to a process of increasing knowledge about the ecology of *Legionella* in cooling circuits and its links with its environment (physical, chemical and microbiological) supporting or not their proliferation. Thus, diversity and dynamics of culturable *Legionella pneumophila* were determined in the four nuclear power plants along the Loire for a year and their links with physico-chemical and microbiological parameters were studied. This study revealed a high diversity of *Legionella pneumophila* subpopulations and their dynamic seems to be related to the evolution of a small number of subpopulations. *Legionella* subpopulations seem to maintain strain-specific relationships with biotic parameters and present different sensitivities to physico-chemical variations. The design of cooling circuits could impact the *Legionella* community. The use of monochloramine severely disrupts the ecosystem but does not select biocide tolerant subpopulations.

Keywords: *Legionella*, ecology, diversity, dynamics, biocide, monochloramine.