Approches moléculaires de l'épidémiologie de la légionellose et de la résistance aux antibiotiques chez Legionella pneumophila

Lubana Shadoud

▶ **To cite this version:**

Lubana Shadoud. Approches moléculaires de l'épidémiologie de la légionellose et de la résistance aux antibiotiques chez Legionella pneumophila. Bactériologie. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV008 . tel-01555506

HAL Id: tel-01555506
https://theses.hal.science/tel-01555506

Submitted on 4 Jul 2017

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

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

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« Lubana SHADOUD»

Thèse dirigée par **« Max MAURIN »**

préparée au sein du **Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes**
dans **l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant (Grenoble)**

Approches moléculaires de l'épidémiologie de la légionellose et de la résistance aux antibiotiques chez *Legionella pneumophila*

Thèse soutenue publiquement le **« 17 Juin 2014 »**,
devant le jury composé de :

Prof. Dominique SCHNEIDER, Président de Thèse
PR, Univ. Joseph Fourier, LAPM, CNRS/UJF, UMR 5163, Grenoble

Prof. Patricia DOUBLET, rapporteur
PR, Univ. Lyon 1, CIRI, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Lyon

Prof. Bernard LA SCOLA, rapporteur
PU-PH, Univ. Aix-Marseille II, URMITE, UMR 7278, Marseille

Dr. Sophie JARRAUD, examinateur
MCU-PH, Univ. Lyon 1, CIRI, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Lyon

Prof. Max MAURIN, Directeur de Thèse
PU-PH, Univ. Joseph Fourier, LAPM, CNRS/UJF, UMR 5163, Grenoble

Dédicace

A mes deux grands frères, Mustapha, décédé le 26 avril 2013 ; Yousef décédé le 20 Juin 2006.
Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amertume de votre absence, Vous avez laissé en moi une trace ineffaçable malgré le temps qui défile.
Mustapha, votre sacrifice m'a montré l'exemple et le voie à suivre.
Yousef, vous êtes parti avant terminer votre projet, acceptez ce travail comme s'il est le votre.

Mon père, ma mère, ma famille et ma belle famille, je vous remercie pour tout l'amour et l'encouragement que vous m'avez transmis de loin.
Rama, Roua, et Ranim, mes anges, graçe à vous ma vie était toujours la plus belle, je suis fière de vous.
Feras, Mon cher mari, Je n'aurais rien fait de tout cela sans ton amour.

Remerciements

J'adresse mes plus vifs remerciements à Mme le Professeur Patricia Doublet et Mr. Le Professeur Bernard La Scola pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.
Ce travail a été réalisé grâce a la collaboration avec le Centre de référence de Legionella, Je tiens à remercier les responsables de ce centre, Mr. Le Professeur Jérôme Etienne pour votre aide et votre encouragement, et Mme le Dr. Sophie Jarraud pour avoir suivi mon travail et m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.
Je tiens à adresser mes grands remerciements à Mr. Le Professeur Dominique Schneider, Directeur du Laboratoire Adaptation et Pathogénicité des Micro-organismes, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et avoir accepté de présider ce jury.
J'adresse également un grand merci à tous les membres de l'équipe GEM ‹‹Genomic and Evolution of Microorganisms ››.
Je tiens à remercier très sincèrement Mr. Le Professeur Max Maurin, le directeur de thèse, les mots me manquent pour exprimer ma gratitude pour m'avoir conseillée, encouragée et soutenue tout au long de la thèse avec patience et disponibilité.
Merci tout particulièrement à Mr. Le Professeur Jean François Timsit d'avoir suivi mon travail pendant trois ans.
Une pensée pleine de reconnaissance inspirée par la générosité et la gentillesse de Mr. Le Dr. Jacques Croizé.
Je souhaite remercier vivement tous les techniciens et personnels du laboratoire de Bactériologie et de Virologie de CHU de Grenoble pour leurs conseils et leurs coopérations.

Ces dernières années ont été riches en rencontres précieuses. Je ne me risquerai pas à toutes les citer au risque d'en oublier, mais merci à tous pour ces moments, certains inoubliables…

Table des matières :

Liste de figures : 6
Liste de tables : 6
Liste des abréviations : 7
Introduction bibliographique 9
1. Historique 10
2. Les bactéries du genre *Legionella* 10
2.1. Taxonomie 10
2.2. Génétique 14
2.3. Caractéristiques phénotypiques et biochimiques 18
2.4. Epidémiologie 19
2.4.1. Cycle de vie de *L. pneumophila* 19
2.4.2. Multiplication dans les cellules humaines 21
2.5. Facteurs de virulence chez *L. pneumophila* 22
2.5.1. Métabolisme du fer 23
2.5.2. Les transporteurs d'acides aminés 23
2.5.3. Les protéines de stress 24
2.5.4. Les systèmes de sécrétion 24
2.5.5. La protéine Mip 29
2.5.6. Facteurs impliqués dans l'infection des macrophages 29
2.5.7. Les facteurs impliqués dans l'adhésion 29
3. Les infections humaines dues aux bactéries du genre *Legionella* 34
3.1. Aspects cliniques 35
3.1.1. La fièvre de Pontiac: 35
3.1.2. La maladie des légionnaires ou légionellose : 36
3.1.3. Formes extra-pulmonaires 38
3.2. Modes de contamination : 38
3.3. Facteurs de risque 39
3.3.1. Facteurs de risque individuels : 39
3.3.2. Facteurs de risque collectifs : 40
3.4. Epidémiologie de la légionellose en France et dans le monde 40
3.4.1. Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2012 : (données InVs) 41
3.4.2. Caractéristiques épidémiologiques européennes 46
4. Le diagnostic 48

4.1. Diagnostic de la légionellose 48
4.1.1. Définition des cas de légionellose d'après l'InVS : 48
4.1.2. Anomalies biologiques non spécifiques : 49
4.1.3. Tests bactériologiques spécifiques 49
4.1.3.1. Tests de détection antigénique urinaire : 49
4.1.3.2. La culture 51
4.1.3.3. Diagnostic sérologique 54
4.2. Le diagnostic de la fièvre de Pontiac 60
5. Traitement de la légionellose 60
5.1 Etude de la sensibilité de *L. pneumophila* aux antibiotiques 60
5.1.1 Les tests extracellulaires 60
5.1.2 Les tests intracellulaires : 62
5.1.3 Modèle animal 63
5.2 Le traitement antibiotique 64
5.2.1 Les antibiotiques utilisés pour le traitement de la légionellose : 64
5.2.2 Recommandations thérapeutiques 66
6. Les fluoroquinolones : 67
6.1 Historique et structure : 67
6.2 Mécanismes d'action des fluoroquinolones: 67
6.3 Mécanismes de résistance bactérienne aux fluoroquinolones 71
6.3.1 Altération de la cible : 71
6.3.2 Diminution de l'accumulation des quinolones : 76
6.3.3 La résistance plasmidique: 78
6.4 Résistance chez les bactéries intracellulaires : 79
7. Objectif de mon travail de thèse 80
TRAVAUX PERSONNELS 81
Travail personnel n°1 82
Travail personnel n° 2 115
Discussion générale et perspectives 149
BIBLIOGRAPHIE 155
Résumé 192
Summary 194

Liste de figures :

Figure 1 : Arbre phylogénétique regroupant un grand nombre d'agents bactériens infectieux chez l'Homme, dont les *Legionella* (Ecker, et al. 2005). **12**
Figure 2 : Arbre phylogénétique des Protobactéries, construit par la méthode de Neighbor-Joining d'après le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (Maurin et D 1999). **12**
Figure 3 : Carte circulaire du génome de *L. pneumophila* souche Paris et de gènes spécifiques de la souche *L. pneumophila* Lens. **17**
Figure 4 : la genome de *L. longbeachae* D4968 comparé avec quatre souches de *L. pneumophila* (Corby, Lens, Paris et Philadelphia). (Kozak, Buss, et al. 2010). **18**
Figure 5 : Schema representant les phases intracellulaire et extracellulaire du cycle de vie de *L. pneumophila*. **20**
Figure 6 : Phagocytose par enroulement de *L. pneumophila* par un macrophage humain (Horwitz, 1984). **21**
Figure 7 : Modèle de système de sécrétion de type II. **26**
Figure 8 : Système de sécrétion Dot/Icm. **28**
Figure 10 : régulation de la topologie de l'ADN **33**
Figure 11 : Evolution du nombre de cas et du taux d'incidence des cas notifiés de légionellose, France, 1988 – 2012 (données InVs) **41**
Figure 12 : Nombre mensuel de cas de légionellose selon la date des signes en France, 2012 (données InVs). **42**
Figure 13 : Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1997-2012 . **43**
Figure 14 : Taux d'incidence des cas notifiés de légionellose **44**
Figure 15 : Répartition des facteurs favorisants des cas de légionellose en France, 2012 (données InVs). **44**
Figure 16 : Expositions à risque parmi les cas de légionellose survenue en France, 2009-2012 (données InVs). **45**
Figure 17 : l'incidence des cas de légionellose rapportés par an entre 1995-2012 (données ECDC). **46**
Figure 18 : les nombre de cas rapportés par mois entre 2008-2012 (données ECDC). **47**
Figure 19 : l'incidence rapportée par les payes participantes en 2012 (données ECDC). **47**
Figure 20 : répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionelloses, France , 1996-2012.55
Figure 21: Pharmacophores et structures des principales quinolones qui ont été approuvés pour l'utilisation humaine (Van Bambeke et al 2005) **70**
Figure 22 : Comparaison schématique des cinq familles de pompes à efflux (Piddock 2006) **77**

Liste de tables :

Tableau 1 : Espèces du genre *Legionella* (Diederen 2008). **13**
Tableau 2 : Informations sur les génomes séquencés. **15**
Tableau 3 : Mutations décrites dans les sous unités GyrA et GyrB chez les souches d'*E. coli* résistantes aux fluoroquinolones (Hopkins, Davies et Threlfall 2005) **74**

Liste des abréviations :

ABC : ATP Binding Cassette

ACES : Acide N2-acétamido-amino-Ethano-Sulfonique

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

APT : Amoebae Plate Test

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

ATCC : American Type Culture Collection

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract

BKYE : Buffer Ketoglutarate Yeast Extract

BSYE : Buffered Starch Yeast Extract

BYEB : Buffered Yeast Extract Broth

BYE : Buffered Yeast Extract

CAP : Community-Acquired Pneumonia

CIP : Collection Institut Pasteur

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNRL : Centre National de Références des Légionelles

DO : Densité Optique

EIA : Enzyme ImmunoAssay

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

***Enh* :** Enhanced entry

FISH : Fluorescence *In Situ* Hybridization

Hsp: Heat shock protein

ICT : Immune Chromatographic Test

IFAT : Indirect Immunofluorescence Test

InVS : Institut de Veille Sanitaire

IPTG : Isopropyl- β-D-thiogalactopyranoside

Kb : kilo paire de base

KDa : KiloDaltons

LBA : Lavage BronchoAlvéolaire

LLAPs : *Legionella*-Like Amoebal Pathogens

LPS : LipoPolySaccharide

MATE : Multidrug And Toxic compound Extrusion

MFS : Major Facilitator Superfamily

MIF : Mature Intracellular Form

***mip* :** macrophage infectivity potentiator

Pb : Paire de base

PMQR : Plasmid-Mediated Quinolone Resistance

QRDR : Quinolone Resistance Determining Region

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RIA : RadioImmunoAssay

RND : Resistance Nodulation Division

SBT : Sequence-Based Typing

SMR : Small Multidrug Resistance

SST1 : Systèmes de Sécrétion de Type I

SST2 : Systèmes de Sécrétion de Type II

SST4 : Système de Sécrétion de Type IV

SSTV : Système de Sécrétion de Type V

Introduction bibliographique

1. Historique

La découverte de *Legionella pneumophila* est liée à l'investigation en juillet 1976 de cas multiples de légionellose survenus au cours du 56ème congrès de la légion américaine à Philadelphie (Etats- Unis). En effet, 182 anciens combattants de la légion américaine ont développé une pneumonie atypique, dont 29 sont décédés (McDade, Shepard, et al. 1977, Fraser, Tsai, et al. 1977). L'agent étiologique responsable de cette épidémie a été isolé quelques mois plus tard et nommé *Legionella pneumophila* par McDade 1977 (McDade, Shepard, et al. 1977). Des études épidémiologiques ont désigné le système de climatisation colonisé par cette bactérie comme source d'aérosols infectieux ayant contaminé les légionnaires. Des analyses rétrospectives effectuées sur des prélèvements cliniques de patients atteints de pneumonie de cause inconnue ont permis la mise en évidence de cas de légionellose datant de 1947 à 1959 (McDade, Brenner et Bozeman 1979, Fraser 2005, McDade 2002, Fields, Benson et Besser 2002). Les nombreuses études phénotypiques et génétiques entreprises depuis 1977 ont permis une meilleure connaissance de la diversité des espèces et du pouvoir pathogène des bactéries du genre *Legionella* (Brenner, Steigerwalt et McDade 1979). Cependant, *L. pneumophila* demeure le principal agent étiologique de la légionellose (Roige et Rello 2003).

2. Les bactéries du genre *Legionella*

2.1. Taxonomie

Les bactéries du genre *Legionella* appartiennent au groupe gamma des Proteobacteria (Woese 1987, Hookey, et al. 1996, Riffard 1997). Au sein de ce groupe, l'ordre des Legionellales contient les familles *Legionellaceae* et *Coxiellaceae*. La famille *Legionellaceae* ne contient qu'un seul genre : *Legionella.* Au sein de genre *Legionella*, l'hybridation ADN-ADN entre

deux souches appartenant à une même espèce correspond au moins à 70% d'homologie, alors que ce pourcentage d'homologie est plus faible d'une espèce à l'autre.

A ce jour, le genre *Legionella* comprend 53 espèces, 3 sous-espèces et 70 sérogroupes (Fields, Benson et Besser 2002, Park, et al. 2006, B. Diederen 2008, Paul Christian Lück et Gronow 2010). D'autres espèces ont été différenciées par hybridation ADN-ADN mais non encore nommées (Garrity, Bell et Lilburn 2005).

Hookey et al (Hookey, et al. 1996) ont rapporté en 1996 la possibilité de différencier la plupart des espèces de *Legionella* par analyse de l'ADNr16S. Riffard et al (Riffard 1997) ont proposé de regrouper les espèces proches en trois groupes phylogénétiques sur la base de l'analyse de l'espace intergénique ADN 16s et 23s. Cependant, l'amplification et le séquencage du gène *mip*, codant pour une protéine nommée Macrophage Infectivity Potentiator impliquée dans le pouvoir pathogène des *Legionella*, est une méthode plus discriminante pour différencier l'ensemble des espèces de *Legionella* décrites actuellement (Ratcliff, et al. 1998). De façon générale, les espèces qui présentent une auto-fluorescence bleu pâle lors de l'exposition des colonies à la lumière ultraviolette (lampe de Wood) sont proches génétiquement (Hookey, et al. 1996). *L. wadsworthii* ne révèle pas d'autofluoresence mais est génétiquement proche des espèces présentant une fluorescence bleu pâle.

Environ la moitié des espèces de *Legionella* reconnues actuellement ont été isolées au moins une fois chez l'Homme (Jarraud et Freney 2012). *L. pneumophila* demeure l'espèce le plus souvent en cause au cours des infections humaines, représentant environ 90% des légionelloses (Benson et Fields 1998). L'étude de l'antigène O du lipopolysaccharide bactérien permet de différencier des sérogroupes chez chaque espèce de *Legionella* (Ciesielski, Blaser et Wang 1986). *L. pneumophila* comprend 15 sérogroupes, mais le sérogroupe 1 est responsable de plus de 90% des infections humaines dues à cette espèce (Yanez, et al. 2005, Newton, et al. 2010).

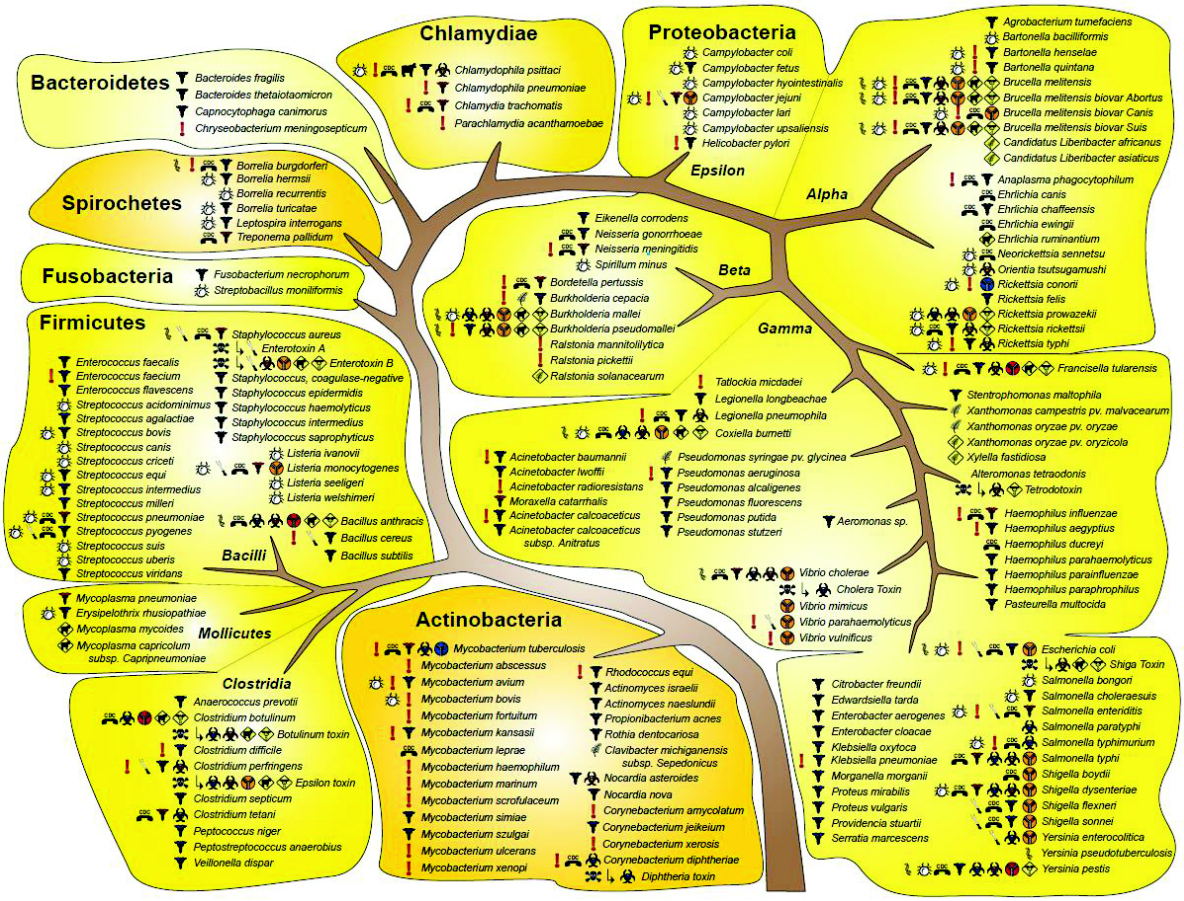


Figure 1 : Arbre phylogénétique regroupant un grand nombre d'agents bactériens infectieux chez l'Homme, dont les *Legionella* (Ecker, et al. 2005).

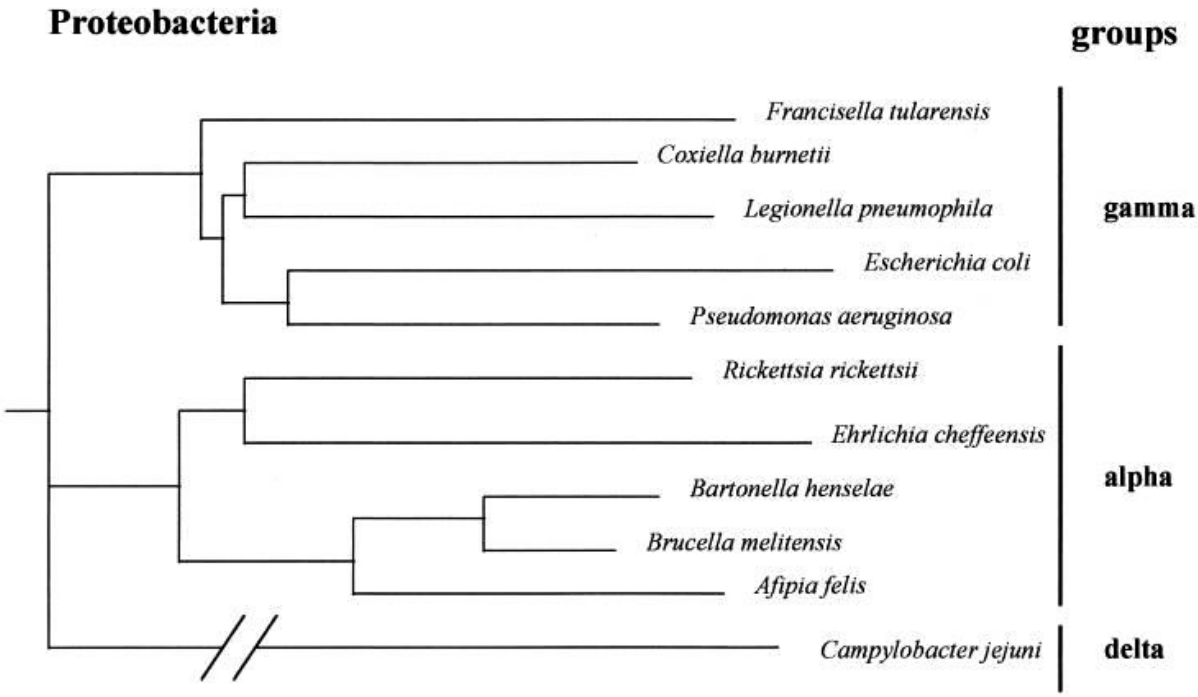


Figure 2 : Arbre phylogénétique des Protobactéries, construit par la méthode de Neighbor-Joining d'après le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (Maurin et D 1999).

Tableau 1 : Espèces du genre *Legionella* (Diederen 2008).

*** : espèces de *Legionella* isolées chez l'homme.**

http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=*LEGIONELLA*.

L. adelaidensis	*L. londiniensis*
*L. anisa**	*L. longbeachae**
L. beliardensis	*L. lytica**
*L. birminghamensis**	*L. maceachernii**
L. bozemanae	*L. micdadei**
*L. bozemanii**	*L. moravica*
L. brunensis	*L. nautarum*
L. busanensis	*L. oakridgensis**
L. cherrii	*L. parisiensis**
*L. cincinnatiensis**	*L. pittsburghensis*
L. drancourtii	*L. pneumophila**
L. drozanskii	*L. quateirensis*
*L. dumoffii**	*L. quinlivanii*
*L. erythra**	*L. rowbothamii*
L. fairfieldensis	*L. rubrilucens*
L. fallonii	*L. sainthelensis**
*L. feeleii**	*L. santicrucis*
L. geestiana	*L. shakespearei*
*L. gormanii**	*L. spiritensis*
L. gratiana	*L. steigerwaltii*
L. gresilensis	*L. taurinensis*
*L. hackeliae**	*L. tucsonensis**
*L. israelensis**	*L. wadsworthii**
L. impletisoli	*L. waltersii*
L. jamestowniensis	*L. worsleiensis*
*L. jordanis**	*L. yabuuchiae*
*L. lansingensis**	

La première souche de LLAP (*Legionella*-like Amoebal Pathogens) décrite a été isolée par Wincenty Drozqanski en 1954 à partir d'un échantillon de sol des environs de Lublin en Pologne, et nommé *Sarcobium lyticum* (Drozanski 1991). Une souche de LLAP a été isolée de l'expectoration d'un patient souffrant de pneumonie en 1993 (T. Rowbotham 1993). Les LLAPs se caractérisent par leur aptitude à parasiter les amibes de l'environnement et leur incapacité à former des colonies sur des milieux de culture acellulaires (Adeleke, et al. 1996, T. Rowbotham 1993). Les analyses phylogénétiques basées sur les séquences des gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S ou la protéine MIP ont conduit à une reclassification de certains LLAPs dans le genre *Legionella* : *L. drozanskii, L. fallonii, L. rowbothamii*, *L. lytica* et *L. drancourtii* (Adeleke, et al. 2001, La Scola, Birtles, et al. 2004). Cette dernière espèce décrite en 2004 par La-Scola et al (La Scola, Birtles, et al. 2004) semble pouvoir se développer en milieux axéniques (Chien, et al. 2004, Jarraud et Freney 2012).

2.2. Génétique

Les génomes de sept souches de *Legionella* sont disponibles dans GenBank. Il s'agit de cinq souches de *L. pneumophila* de sérogroupe 1 : *Philadelphia, Paris* et *Lens* (Cazalet, Rusniok, et al. 2004), *Corby* (Steinert, et al. 2007) et *Alcoy* (D'Auria, et al. 2010); et de deux souches de *L. longbeachae* : D4968 et NSW150 (Kozak, Benson, et al. 2009, Cazalet, Gomez-Valero, et al. 2010).

La souche Philadelphia responsable de l'épidémie de 1976 à Philadelphie a été isolée à partir d'un prélèvement autopsique d'un patient décédé de légionellose (Fraser, Tsai, et al. 1977). La souche Paris est endémique, et responsable de 12,7 % et 33% des cas de légionellose survenant respectivement en France et dans la région parisienne (Aurel, et al. 2003). La souche Lens a été responsable d'une grande épidémie de légionellose dans le Nord de la France entre 2003 et 2004. La souche Corby (Steinert, et al. 2007) a été isolée et séquencée par l'Institut Fritz Lipmann en Allemagne (Glöckner, et al. 2008) chez un patient atteint de

légionellose. La souche Alcoy, isolée à partir d'un patient (Fernandez, et al. 2002), a été responsable d'une épidémie étendue de légionellose en Espagne suite à la contamination d'une tour aéroréfrigérante industrielle.

La taille des génomes des cinq souches de *L. pneumophila* est très similaire (environ 3,5 Mpb) (Chien, et al. 2004, Cazalet, Rusniok, et al. 2004). Le génome de 5 souches de *L. pneumophila* comprend environ 3000 gènes et présente une composition en G+C comprise entre 38 et 38,5% (tableau 2).

Tableau 2 : Informations sur les génomes séquencés.

Source http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/416

Souches[a]		Numéro d'accession	Numéro GenBank	Taillle (Mbp)	Contenu en GC (%)	Nombre de gènes	Nombre de protéines	RNAs
Philadelphie	Chromosome	NC_002942	AE017354	3,39775	38,3%	3002	2942	52
	Plasmide pLP45			0,045				
Lens	Chromosome	NC_006369	CR628337	3,345687	38,4%	2931	2878	54
	Plasmide pLPL	NC_006366	CR628339	0,059832	38,4%	57	56	--
Paris	Chromosome	NC_006368	CR628336	3,503610	38,4%	3077	3027	54
	Plasmide pLPP	NC_006365	CR628338	0,131885	37,4%	142	139	--
Corby	Chromosome	NC_009494	CP000675	3,6	38%	3259	3206	53

Une région chromosomique capable de s'exciser et de se maintenir sous forme de plasmide a été détectée chez les cinq souches de *L. pneumophila*. Ces événements d'excision et d'intégration se succèdent en fonction de la phase de croissance chez la souche Paris (Doleans-Jordheim, et al. 2006). Chez la souche Corby, la forme épisomique pourrait être conjugative (Glockner, et al. 2008). Environ 40 % des gènes appartenant à ces cinq génomes codent une fonction inconnue et 20 % sont uniques au genre *Legionella*. Par ailleurs, 3,5 % des protéines déterminées comportent des domaines spécifiques ou ressemblant à des protéines eucaryotes (Gomez-Valero, Rusniok et Buchrieser 2009). Ces protéines jouent un rôle dans la virulence en perturbant la machinerie des cellules hôtes, notamment le trafic vésiculaire, lorsqu'elles sont secrétées par des systèmes de translocation (voir section

systèmes de sécrétion). Les gènes codant ces protéines peuvent être transférés horizontalement (Franco, Shuman et Charpentier 2009).

Le chromosome des deux souches de *L. longbeachae* de sérogroupe (D4968 et NSW150) présente une taille d'environ 4 Mpb, plus grande de plus de 10% par rapport à celui de *L. pneumophila* ce qui correspond à un nombre plus important de gènes prédits (Cazalet, Gomez-Valero, et al. 2010, Kozak, Buss, et al. 2010). Cependant, la fraction codante des génomes est identique chez *L. pneumophila* et *L. longbeachae*. Il existe des réarrangements chromosomiques multiples entre les souches d'une même espèce ou d'espèces différentes, ce qui montre une plasticité particulière des génomes des *Legionella.* Environ 34 % des gènes sont spécifiques de *L. longbeachae*, avec des différences importantes concernant les gènes codant pour des facteurs de virulence. Par exemple, concernant le système de sécrétion de type IVb, on n'observe une homologie que pour la moitié des effecteurs entre *L. pneumophila* et *L. longbeachae* (Cazalet, Gomez-Valero, et al. 2010, Kozak, Buss, et al. 2010)*,* Ces différences génétiques correspondent probablement à une adaptation à des niches écologiques différentes. En particulier, *L. longbeachae* possède des gènes impliqués dans les processus de dégradation des cellules de végétaux et d'insectes (cellulase, xylanase, chitinase).

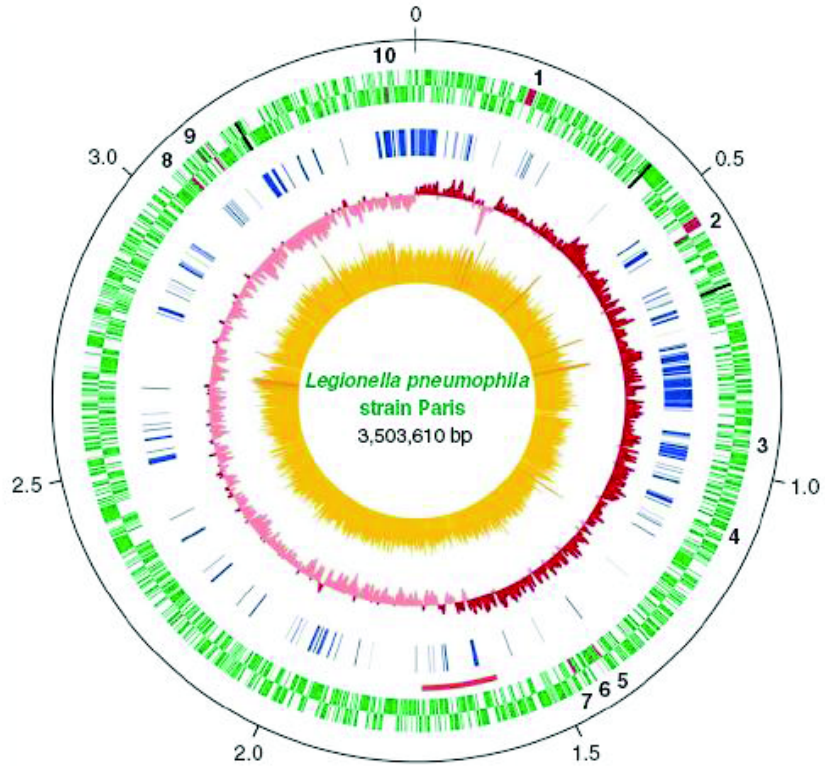


Figure 3 : Carte circulaire du génome de *L. pneumophila* souche Paris et de gènes spécifiques de la souche *L. pneumophila* Lens.

De l'extérieur vers l'intérieur du cercle : le premier cercle indique l'échelle de taille (en millions de paires de bases) et l'origine de réplication à la position 0. En vert, il s'agit des gènes de la souche Paris sur les brins + et – respectivement ; en noir sont indiqués les opérons d'ARN ribosomiques, en rouge certains gènes impliqués dans la virulence tels que : 1- le système de sécrétion de type IVa Lvh/Lvr (*lvrABC*, *lvhB2B3B4B5*, *lvrD*, *lvhB6B8B9B10B11D4*, *lvrE*) ; 2- le système de sécrétion de type IV Icm/Dot (*icmTSRQOMLKEGCDJBF*) ; 3- le gène *mip* ; 4- le gène *lspA* ; 5- les gènes *lspDE* ; 6- le gène *htrA* ; 7- les gènes *lspFGHIJK* ; 8- les gènes *enhABC* ; 9- le système de sécrétion de type IVb Icm/Dot(*icmVWX* et *dotABCD*) ; 10- le gène *momP*. Le trait rouge indique une inversion dans la souche Lens. Le deuxième cercle en bleu représente les gènes spécifiques de la souche Lens par arpport à la souche Paris. Le troisième cercle en rouge indique le biais G/C (G+C/G-C) de la souche Paris. Le quatrième cercle indique le pourcentage G+C de la souche Paris : en jaune clair, 32.5 % G+C, en jaune, entre 32,5 et 44,1 % G+C ; en jaune foncé, 44,1 % G+C (Cazalet, Rusniok, et al. 2004).

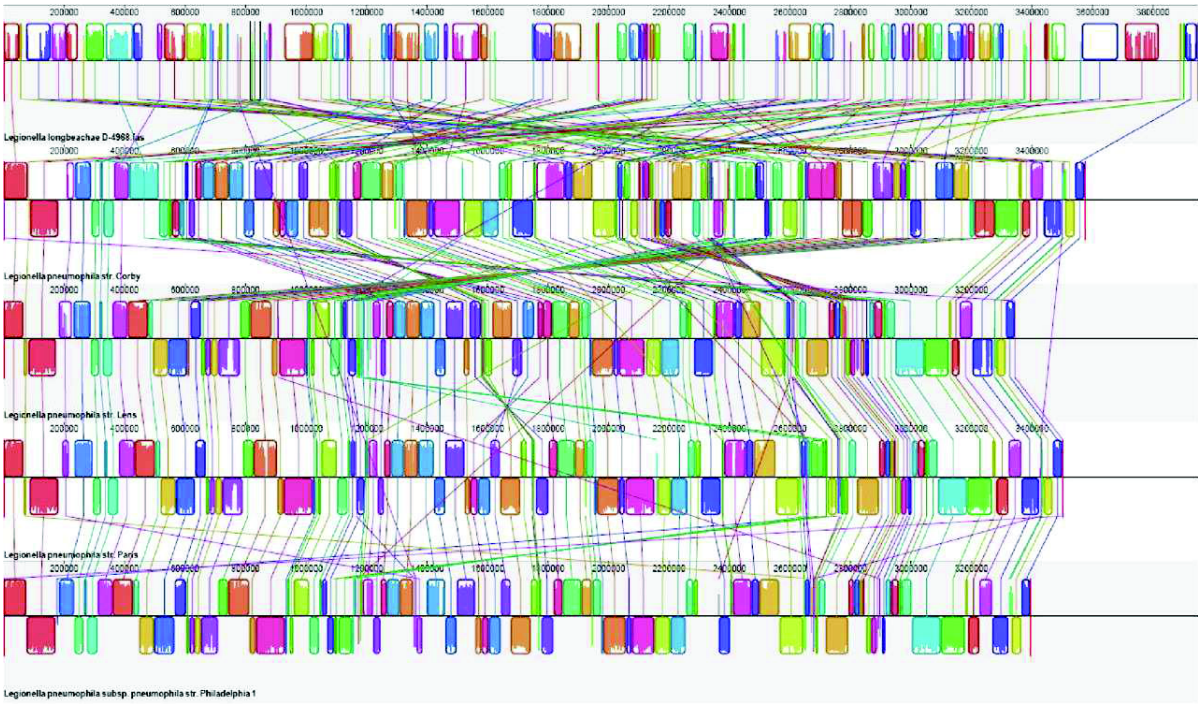


Figure 4 : la genome de *L. longbeachae* D4968 comparé avec quatre souches de *L. pneumophila* (Corby, Lens, Paris et Philadelphia). (Kozak, Buss, et al. 2010).

2.3. Caractéristiques phénotypiques et biochimiques

L. pneumophila est un bacille à Gram négatif, faiblement coloré par cette technique, aérobie strict, non sporulé, hétérotrophe, mobile grâce à un ou plusieurs flagelles (Ott, et al. 1991), de 0,3-0,9 µm de large et 2-20 µm de long, pouvant présenter en culture des formes allongées parfois filamenteuses (B. Diederen 2008).

Des variations existent entre espèces de *Legionella*. Par exemple, *L. longbeachae* présente une structure de type capsule par observation au microscope électronique et possède des gènes impliqués dans la production de cette structure (Cazalet, Gomez-Valero, et al. 2010). Cette espèce ne possède aucun gène codant pour la biosynthèse d'un flagelle (Cazalet, Gomez-Valero, et al. 2010, Stout et Yu, Legionellosis 1997).

Les *Legionella* sont des bactéries chimio-organotrophes, les acides aminés synthétisés leur servant de source d'énergie et de carbone (Benson et Fields 1998, Fliermans 1996). Elles sont auxotrophes pour la L-cystéine et nécessitent du fer pour leur multiplication (Mintz, Chen et Shuman 1988, Fields, Benson et Besser 2002). Elles ne fermentent pas le glucose, ne réduisent pas les nitrates, ni l'urée. Elles sont positives pour la catalase et la gélatinase.

La composition de leur paroi bactérienne se différencie des autres bactéries à Gram négatif par leur richesse en acides gras ramifiés, ce qui les rapproche des bacilles à Gram positif (Moss, Karr et Dees 1981, Jarraud et Freney 2012). Les acides hydroxylés composant la partie lipidique du LPS des *Legionella* ont également une utilité taxonomique permettant de différencier les espèces de ce genre (Jantzen et Bryn 1994).

L'électrophorèse de type SDS-PAGE des protéines cytoplasmiques solubles offre un intérêt pour l'identification des espèces de *Legionella* (Fields, Benson et Besser 2002).

Les *Legionella* renferment des sucres, notamment du rhamnose, du ribose, du mannose, de l'acide muramique, de la glucosamine et de la quinovosamine (à l'exception de *L.gormanii*). Seules des traces de glucose ont été retrouvées. Certaines souches de *Legionella* possèdent de la quinovosamine et de la fucosamine (à l'exception de *L. pneumophila* et *L. gormanii*) (Fox, lau, et al. 1984, Fox, Rogers, et al. 1990).

Les phosphatidilcholines, lipides polaires, sont des composants majeurs de la membrane des *Legionella* (Mauchline, et al. 1992). Les ubiquinones présentent une autre particularité rare qui est la présence de chaînes latérales isoprénoïdes comprenant 9 à 14 unités isoprènes (Moss, Bibb, et al. 1983), alors que ces chaînes sont composées de 6 à 10 unités chez les autres bactéries à Gram négatif.

2.4. Epidémiologie

2.4.1. Cycle de vie de *L. pneumophila*

Le cycle de vie de *L. pneumophila* est biphasique, comprenant une étape réplicative et une étape infectieuse ou transmissive (Molofsky et Swanson 2004)**.** Ce cycle commence par la phagocytose de la bactérie par une cellule eucaryote (amibes, macrophages) et son internalisation dans un phagosome. A ce stade, *L. pneumophila* produit des facteurs de virulence qui empêchent la fusion de ce phagosome avec les lysosomes et favorise des interactions avec le réticulum endoplasmique pour former un endosome spécifique (Horwitz 1983). La phase réplicative se déroule à l'intérieur de cette nouvelle vacuole, l'expression des

facteurs de virulence bactériens étant réprimée. La multiplication bactérienne aboutit à une carence en nutriments qui active la transition vers la phase infectieuse (Brüggemann, et al. 2006). Les bactéries redeviennent virulentes, détruisent la cellule hôte notamment par formation de pores membranaires (Gao et Abu Kwaik 2000, Abu-Zant, et al. 2007). Les bactéries libérées vont infecter d'autres cellules eucaryotes pour établir un nouveau cycle infectieux. La phase infectieuse est caractérisée par l'acquisition de flagelles et la résistance à différents stress chez *L. pneumophila* (Molofsky et Swanson 2004, Newton, et al. 2010) (figure 5). En l'absence de nouvelles cellules hôtes, *L. pneumophila* peut évoluer vers une phase stationnaire permettant sa survie dans des conditions défavorables, notamment au sein de biofilms. Un parallèle a été suggéré entre les phases réplicative et transmissive lors de l'infection d'un hôte eucaryote et les phases exponentielle et stationnaire lors de cultures in vitro de *L. pneumophila* (Molofsky et Swanson 2004).

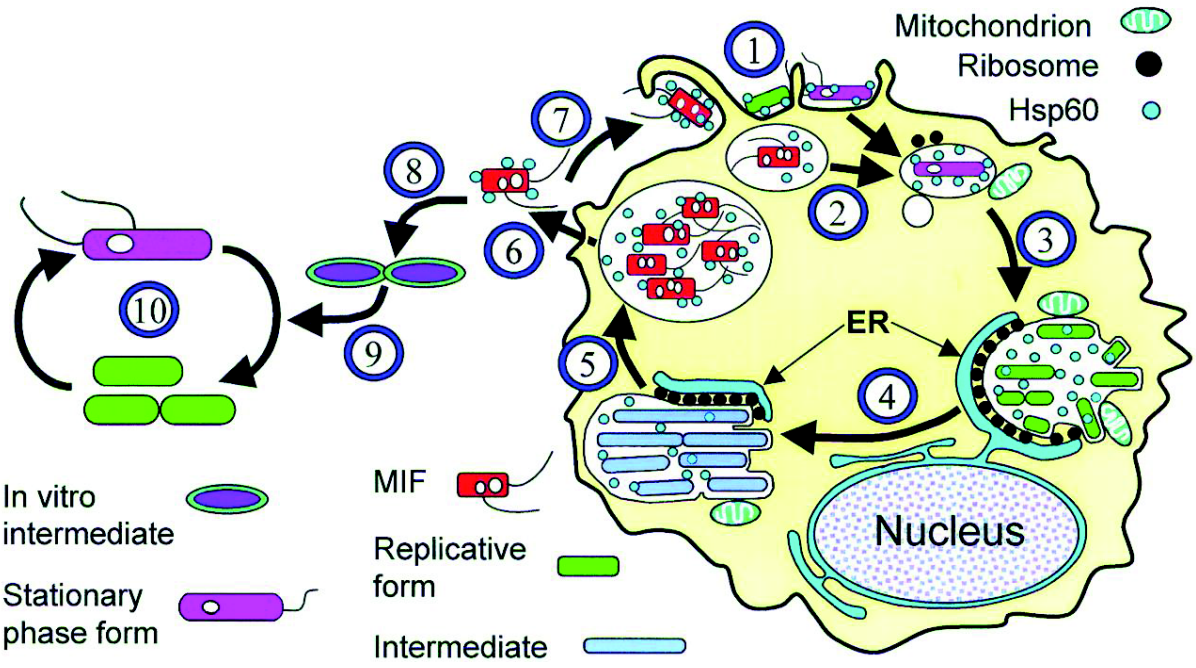


Figure 5 : Schema representant les phases intracellulaire et extracellulaire du cycle de vie de *L. pneumophila*. (Faulkner et Garduño 2002).

2.4.2. Multiplication dans les cellules humaines

Les *Legionella* sont capables d'infecter plusieurs types de cellules eucaryotes, notamment certains protozoaires de l'environnement et des cellules humaines telles que les monocytes/macrophages et les pneumocytes de type I et II. Les cellules humaines seraient des hôtes « accidentels » des *Legionella*, dont la capacité de multiplicatoin intracellulaire aurait été probablement développée initialement pour résister à la phagocytose par les amibes libres de l'environnement (figure 6) . Les mécanismes de résistance à la digestion par les macrophages humains sont comparables à ceux observés chez les protozoaires. Toutefois, certains loci comme *mil* (macrophage-specific infectivity locus) sont indispensables à la multiplication dans les macrophages, ce qui suggère une adaptation ultérieure spécifique à ces cellules hôtes. La multiplication des bactéries dans les macrophages induit leur apoptose en interférant avec la voie NF-κB (Gao et Abu Kwaik 2000, Abu-Zant, et al. 2007). Les *Legionella* libérées vont pouvoir infecter d'autres cellules eucaryotes. Il en résulte une propagation rapide de l'infection.

Figure 6 : Phagocytose par enroulement de *L. pneumophila* par un macrophage humain (Horwitz, 1984).

2.4.3. Régulation du cycle biphasique des *Legionella*

L'expression des gènes chez *L. pneumophila* varie en fonction de la phase du cycle cellulaire (Brüggemann, et al. 2006). La phase réplicative se caractérise par la transcription préférentielle de gènes impliqués dans l'utilisation des sources de carbone et le métabolisme des acides aminés, alors que la phase transmissive est associée à une augmentation de la transcription des gènes effecteurs du système Dot/Icm, des gènes de biosynthèse du flagelle et des gènes modulant la quantité de molécules signal.

L'infection de la cellule eucaryote par *L. pneumophila* est un processus complexe contrôlé par trois différents systèmes de régulation globale de l'expression des gènes de virulence chez cette bactérie: CpxAR, PmrAB et LetAS. Les deux premiers régulent directement durant la phase transmissive l'expression de gènes codant des composants et des effecteurs du système Dot/Icm (Gal-Mor et Segal 2003, Zusman, et al. 2007, Al-Khodor, et al. 2009, Altman et Segal 2008, Steinert, et al. 2007). Le troisième, LetAS, constitue un des plus importants points de contrôle de la transition entre les phases réplicative et transmissive (Gal-Mor et Segal 2003, Al-Khodor, et al. 2009, Lynch, et al. 2003), en contrôlant notamment un régulateur clé de la phase réplicative, CsrA. La protéine CsrA est un répresseur post-transcriptionnel de l'expression des gènes impliqués dans la phase transmissive (Molofsky et Swanson 2003). Elle est impliquée dans la croissance, la virulence, la formation de biofilms et l'entrée en phase stationnaire (Forsbach-Birk, et al. 2004, Wang, et al. 2005).

2.5. Facteurs de virulence chez *L. pneumophila*

Les facteurs de virulence sont les éléments impliqués dans la pathogénicité d'une bactérie. Chez *L. pneumophila*, les facteurs de la phase réplicative sont ceux impliqués dans l'acquisition du fer et des acides aminés, les protéines de stress, les systèmes de sécrétion, la protéine Mip et les facteurs impliqués dans l'infection des macrophages. Les facteurs de la phase infectieuse sont responsables des interactions des *Legionella* avec les cellules

eucaryotes, tels que le LPS, la protéine MOMP, les pili, le flagelle et les cytotoxines. Il est important de noter ici que certains facteurs de virulence peuvent être impliqués dans les deux phases.

2.5.1. Métabolisme du fer

Les bactéries pathogènes nécessitent du fer pour se multiplier dans leurs hôtes (Sutak, et al. 2008). Chez *L. pneumophila*, une altération de l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer entraîne une réduction ou une perte de sa capacité à se multiplier dans les cellules eucaryotes. Deux types de sidérophores sont impliqués dans la virulence : le type aérobactine dont la synthèse dépend du gène *frgA* (Fur-regulated gène A) qui code une protéine homologue aux aérobactines synthétases LucA et LucC d'*E. Coli* (Hickey et Cianciotto 1997), et la légiobactine qui est un sidérophore spécifique des bactéries du genre *Legionella* et présente une structure différente des sidérophores connus chez d'autres bactéries (Liles, Scheel et Cianciotto 2000, Allard, Dao, et al. 2009). Les gènes *lbtA, B* codent respectivement la synthétase et la protéine d'export de la légiobactine (Allard, Viswanathan et Cianciotto 2006). D'autres facteurs sont responsables de l'assimilation du fer, comme les protéines IraAB et FeoB qui sont des transporteurs membranaires également nécessaires à la multiplication intracellulaire (Viswanathan, Edelstein, et al. 2000, Robey et Cianciotto 2002). La protéine FeoB est notamment responsable du transport du fer à travers la membrane plasmique (Cianciotto 2007). Le facteur CcmC de maturation du cytochrome c, codé par le gène *ccmC*, est nécessaire à la formation du cytochrome C qui permet l'assimilation du fer (Viswanathan, Kurtz, et al. 2002). Les protéines FeoB, CcmC et IraA sont nécessaires à la multiplication intracellulaire de *Legionella* dans différents hôtes eucaryotes.

2.5.2. Les transporteurs d'acides aminés

L'apport d'acides aminés nécessaires à la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* dépend de transporteurs spécifiques tels que Pht (Phagosomal transporter) (Sauer, Bachman et Swanson 2005). La protéine PhtA est un transporteur de la thréonine, un acide aminé essentiel

pour *L. pneumophila* durant la phase réplicative (Sauer, Bachman et Swanson 2005). Des mutants du gène *phtA* sont incapables de se multiplier dans les macrophages. Une dizaine de protéines Pht ont été identifiées dans les génomes disponibles de toutes les souches de *Legionella* (Chen, et al. 2008).

2.5.3. Les protéines de stress

La survie intracellulaire de *L. pneumophila* nécessite une résistance à certains stress, notamment le stress oxydatif. Actuellement, quatre protéines de stress impliquées dans la virulence chez *Legionella* ont été caractérisées : GspA, KatAB, SodB et SodC.

La protéine GspA (Global stress protein) est exprimée en réponse à quatre stress intracellulaires : choc thermique, stress oxydatif, choc acide et choc osmotique. (Abu Kwaik, Gao, et al. 1997).

Le complexe protéique KatAB est indispensable pour conserver un taux de composés oxygénés très bas, permettant la multiplication des bactéries dans le phagosome (Bandyopadhyay, Byrn, et al. 2003).

La protéine superoxide dismutase SodB dépend du fer, et la protéine SodC dépend du cuivre et du zinc, ces deux protéines renforcent la résistance des cellules bactériennes aux stress oxydatifs lors de l'invasion des cellules eucaryotes (Sadosky, et al. 1994, St John et Steinman 1996).

2.5.4. Les systèmes de sécrétion

Chez *L. pneumophila*, quatre types de systèmes de sécrétion ont été décrits : I, II, IVa et IVb. Le système de sécrétion de type V a été mis en évidence spécifiquement chez la souche Paris (Cazalet, Rusniok, et al. 2004).

2.5.4.1. Le système de sécrétion de type II

La virulence et la persistance dans l'environnement de *L. pneumophila* sont liées au système de sécretion II appelé Lsp (*Legionella* secretion pathway- figure 7) (Soderberg, et al. 2008). Ce système permet l'export d'environ une vingtaine des protéines tels que les toxines, protéases et autres types de protéines qui interférent avec la machinerie de l'hôte (Cianciotto 2009). Le système Lsp est codé par cinq loci génétiques répartis sur le chromosome, dont pilBCD impliqué dans la synthèse des Pili de type IV, lspFGHIJK qui code des pseudopilines constituants du pseudopilus (Rossier et Cianciotto 2001), lspDE codant la sécrétine de la membrane externe et l'ATPase, et lspC et lspLM qui sont probablement impliqués dans la sécrétion (Rossier, Starkenburg et Cianciott 2004). Une mutation de *pilD* qui code une pseudopiline peptidase affecte la capacité de *L. pneumophila* à infecter les cellules hôtes. La mutation de lspGH affecte la multiplication intracellulaire dans les amibes (Aragon, Rossier et Cianciotto 2002, Hales et Shuman 1999). Ces mutants ont également leur impact sur la survie dans l'environnement et l'adhésion aux surfaces, la formation de biofilms, et la mobilité via la sécrétion potentielle d'un surfactant de surface (Stewart, Rossier et Cianciotto 2009).

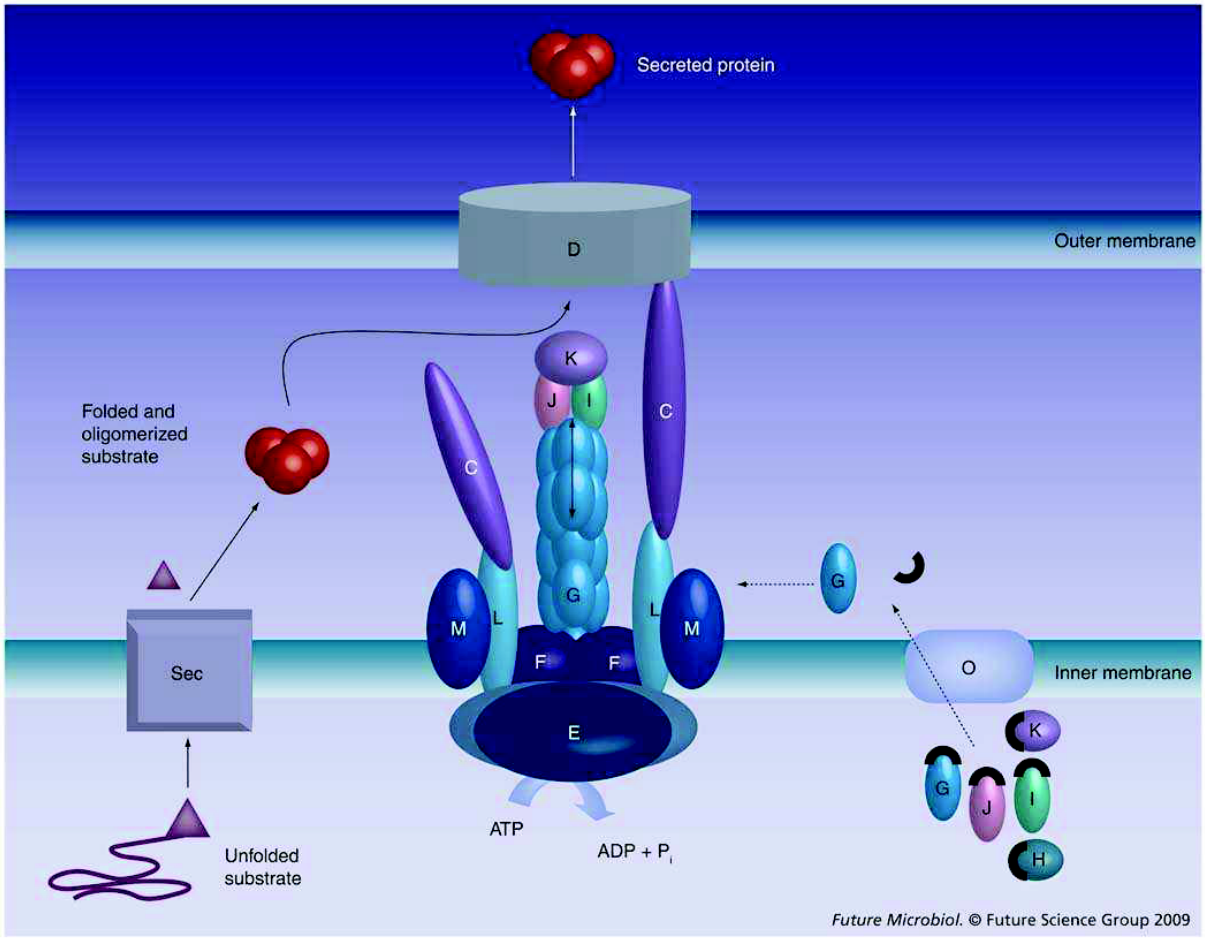


Figure 7 : Modèle de système de sécrétion de type II.

Les substrats sont transloqués à travers la membrane interne (Inner membrane) via le système Sec (le système Tat n'est pas représenté). Ensuite, un pilus extensible constitué des protéines G (pseudopiline majeure), J, K et I (pseudopilines mineures) vont pousser les substrats à travers la sécrétine dodécamérique D et permettre leur passage à travers la membrane externe (Outer membrane). La prépiline peptidase O permet l'incorporation des pseudopilines au pilus après clivage et methylation. C–M: constituants de l'appareil de sécrétion de type II ; H: pseudopiline mineure. D'après (Cianciotto, 2009).

2.5.4.2. Le système de sécrétion de type IV (SST4)

Un système de type IVa, appelé Lvh pour « *Legionella* vir homolog », et un système de type IVb, appelé Dot/Icm (Defective in Organelle Trafficking/IntraCellular Multiplication) forment les systèmes de sécrétion SST4 permettant le transfert de gènes par conjugaison.

Le système de type IVb (Dot/Icm)

Les gènes codant le système de sécrétion de type IVb, Dot (Segal, Purcell et Shuman 1998) et Icm (Vogel, et al. 1998), ont été identifiés par deux équipes, puis nommés Dot/Icm. Ils sont impliqués dans la multiplication intracellulaire, l'entrée des bactéries, l'inhibition de l'apoptose et la sortie des bactéries de la cellule hôte. Les constituants de Dot/Icm formeraient

une structure multiprotéique de type translocon traversant la membrane plasmique et la membrane externe (figure 8) (Vincent, et al. 2006), et entraînant l'insertion d'un port de translocation dans la membrane plasmique de la cellule hôte (Isberg, O'Connor et Heidtman 2009). Dans la cellule hôte, le système Dot/Icm transloque environ 200 protéines effecteurs représentant 10% du protéome de *L. pneumophila* (Burstein, et al. 2009, Isberg, O'Connor et Heidtman 2009, Ziv Lifshitz 2013).

Les constituants du système Dot/Icm sont codés par un groupe de 26 gènes localisés sur deux régions distinctes du chromosome (Segal, Purcell et Shuman 1998, Matthews et Roy 2000, Vincent, et al. 2006). Une délétion de certains de ces gènes affecte la virulence des bactéries pour les macrophages et les amibes (Franco, Shuman et Charpentier 2009). Plus de 65% des protéines codées par ces gènes présentent des homologies avec des systèmes bactériens de transfert conjugatif d'ADN et le système Dot/Icm est également capable de mobiliser certains plasmides (Vogel, et al. 1998). Cette capacité de conjugaison via le système de sécrétion Dot/Icm peut permettre aux bactéries du genre *Legionella* d'acquérir des traits de virulence (Vogel *et al*., 1998). Par ailleurs, il a également été démontré que les gènes *dot*/*icm* pouvaient être transférés horizontalement entre souches de *Legionella* de sérogroupes différents, permettant ainsi à une souche avirulente d'acquérir un phénotype virulent (Miyamoto, et al. 2003). Certains auteurs supposent que l'acquisition de gènes codant des effecteurs possédant des motifs protéiques de nature eucaryote pourrait se produire lors d'événements de transferts horizontaux. Ce transfert de gènes pourrait également se produire à l'intérieur de biofilms (Franco, Shuman et Charpentier 2009, Lurie-Weinberger, et al. 2010).

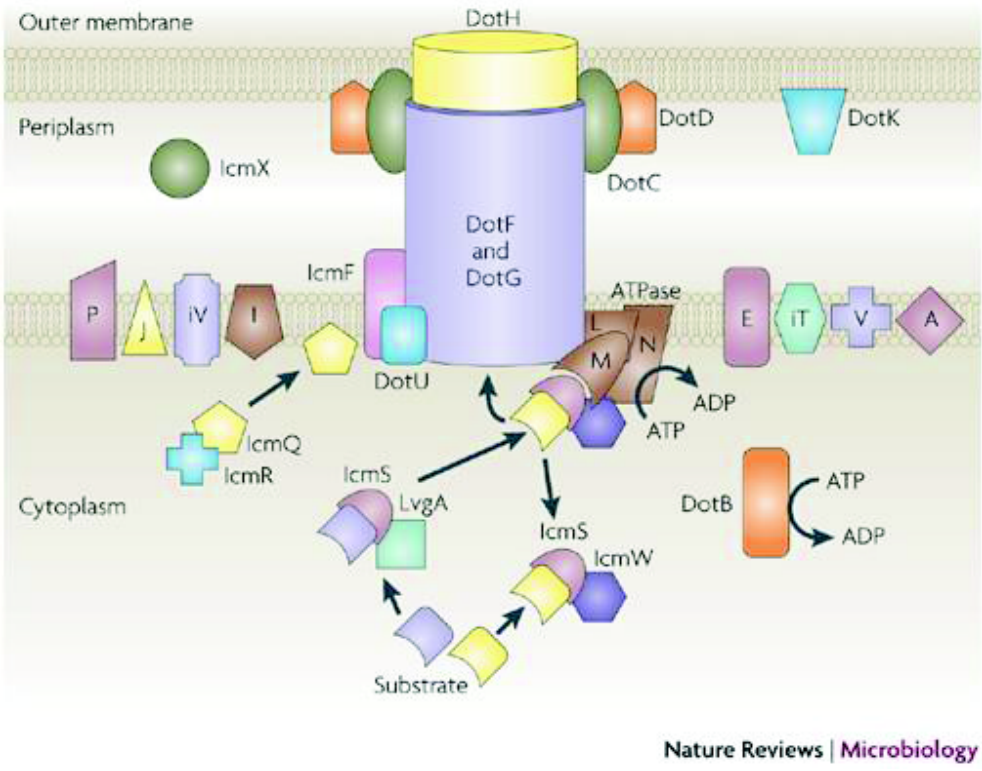


Figure 8 : Système de sécrétion Dot/Icm.
Emplacements présumés et relations topologiques des différents composants Dot / Icm.
Des composants de l'enveloppe de *L. pneumophila* sont présentés sur la base d'une étude de stabilité des protéines individuelles en présence de mutations de délétion. Les lettres individuelles représentent les noms de protéines Dot, alors que les lettres précédées par un «i» indiquent des noms de protéines Icm.
http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n1/fig_tab/nrmicro1967_F3.html#figure-title

Le système de secretion de type IVa

Le système de sécrétion de type IVa, appelé Lvh, complémente certains déficits de mutants Dot/Icm au niveau de l'invasion de la cellule hôte et de la réplication intracellulaire (Bandyopadhyay, Liu, et al. 2007). Les substrats transloqués par ce système ne sont pour le moment pas identifiés. Le système Lvh est codé par 11 gènes portés par un élément mobile, qui peut exister sous deux formes dans la cellule: intégré dans le chromosome au niveau d'un gène codant un ARNt ou libre sous forme plasmidique. La présence de l'une ou l'autre de ces formes dépend de la phase de croissance (Doleans-Jordheim, et al. 2006). Le système Lvh n'a pas de rôle essentiel dans la virulence de *L. pneumophila*, mais favorise sa multiplication intracellulaire dans les hôtes eucaryotes à 30 °C (Ridenour, et al. 2003).

2.5.5. La protéine Mip

La protéine Mip (macrophage infectivity potentiator) contribue à la survie de *L. pneumophila* par des mécanismes inconnus. Il s'agit d'une protéine homodimérique de surface de 24kDa codée par le gène *mip*. Son activité peptidylprolyl cis/trans isomérase est indispensable dans les étapes d'invasion des cellules hôtes et de survie intracellulaire, mais pas pour la multiplication bactérienne intracellulaire, ni pour l'invasion d'amibes comme *A. castellanii* (Cianciotto 2001, Wieland, et al. 2002, Kohler, et al. 2003).

2.5.6. Facteurs impliqués dans l'infection des macrophages

Ces facteurs sont codés par quatre loci chromosomiques et interviennent dans les processus d'infection des macrophages : *pmi* (protozoa and macrophage infectivity), *mil* (macrophage infectivity locus), *eml* (early stage macrophage-induced locus) et *enh* (enhanced entry) (Abu Kwaik et Pederson 1996, Gao, Stone, et al. 1998, Harb et Abu Kwaik 2000, Cirillo, Lum et Cirillo 2000). Trois loci appelés *enh2*, *enh2*, *enh3* exercent leur activité pour permettre l'entrée des *Legionella* dans la cellule hôte (Cirillo, Lum et Cirillo 2000, Cirillo, Bermudez, et al. 2001). Le gène *rtxA* appartenant au locus *enh1* a été caractérisé. Il intervient dans l'adhérence et l'entrée de *L. pneumophila* dans la cellule hôte, la cytotoxicité et la formation de pores transmembranaires qui aboutit à la lyse de la cellule hôte (Cirillo, Bermudez, et al. 2001).

2.5.7. Les facteurs impliqués dans l'adhésion

Plusieurs structures de surface sont impliquées dans l'adhésion des bactéries du genre *Legionella* aux cellules eucaryotes.

2.5.7.1. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est un constituant de la surface bactérienne qui permet par utilisation d'anticorps monoclonaux (MAb) d'identifier le sérogroupe d'une souche (Helbig, Luck, et al. 1995). Le LPS active chez l'hôte eucaryote les voies classique et alternative du complément (Mintz,

Schultz, et al. 1992). Il permet l'adhésion des cellules de *Legionella* à la muqueuse respiratoire. *L. pneumophila* de sérogroupe 1 présente un phénomène de variation de phase qui permet une variabilité au niveau des épitopes du LPS déjouant la réponse immunitaire.

Le gène *lag-1* code pour la O-acétyltransférase qui permet une grande hydrophobicité représentée par le LPS de certaines souches de *L. pneumophila* de sérogroupe 1 entraînant la formation de résidus O-acétylés sur le polysaccharide O du LPS (Zou, et al. 1999, Kooistra, et al. 2001). Cette hydrophobicité pourrait expliquer la survie dans les aérosols de *L. pneumophila* (Dennis et Lee 1988, Kozak, Benson, et al. 2009).

2.5.7.2. La protéine MOMP

La protéine MOMP (Major Outer Membrane Protein) codée par le gène *ompS* est constituée de deux sous-unités respectivement de 28 et 31 kDa (Hoffman, Seyer et Bulter 1992). Cette protéine est impliquée dans la virulence en permettant l'adhésion aux macrophages au niveau des récepteurs CR1 et CR3 via la liaison des éléments C3 et C3i du complément (Krinos, High et Rodgers 1999).

2.5.7.3. La protéine de choc thermique Hsp60

Cette protéine codée par le gène *htpB* est également impliquée dans l'adhésion aux cellules de mammifères HeLa, le récepteur eucaryote n'étant pas connu (Garduno, Garduno et Hoffman 1998). Elle appartient à la famille des protéines de choc thermique Hsp (Heat shock protein) qui sont produites au cours de l'infection bactérienne et agissent comme des protéines chaperonnes (Garduno, Garduno et Hoffman 1998). Les stress environnementaux comme la chaleur et une grande concentration en H_2O_2 peuvent induire l'expression de cette protéine (Swanson et Hammer 2000).

2.5.7.4. Les pili et le flagelle

Les pili présents sur le surface des *Legionella* sont de type IV ou CAP (Compétence and adhérence-associates Pili) et sont impliqués dans l'adhésion et la virulence des bactéries du

genre *Legionella* vis-à-vis des macrophages et des amibes (Stone et Abu Kuaik 1998). Ils peuvent lier le complément et être reconnus comme ligands par les lectines des protozoaires.

Le rôle du flagelle dans la virulence se limite dans la capacité de dissémination et d'invasion des cellules hôtes (Dietrich, et al. 2001, Heuner et Steinert 2003). Une perte de flagelle chez des mutants entraine une diminution de leur capacité à infecter les macrophages et les cellules amibiennes, mais leur taux de réplication intracellulaire n'est pas affecté (Dietrich, et al. 2001). En revanche, la mobilité liée au flagelle est indispensable pour trouver un nouvel hôte à infecter ou pour coloniser de nouveaux habitats (Heuner et Steinert 2003). Le flagelle est une structure complexe, dont la synthèse et la régulation font intervenir 43 gènes (Albert-Weissenberger, et al. 2010, Heuner et Steinert 2003).

2.5.8. Les cytotoxines

Deux toxines ont une activité hémolytique : la légiolysine, une protéine de 39kDa codée par le gène *lly* ; et la métalloprotéase à zinc Msp, codée par *proA* et qui présente plusieurs activités protéolytiques, hémolytiques et cytotoxiques. La protéine Msp est sécrétée par le système de sécrétion Lsp, de type II. Ces toxines sont impliquées dans la lyse des cellules (Quinn et Tompkins 1989). La protéase Msp est capable de diminuer le stress oxydatif au cours de l'infection (Sahney, et al. 2001).

2.5.9. Les protéines contrôlant la topologie de l'ADN

Les fluctuations des conditions environnementales affectent de façon transitoire le niveau de superhélicité de l'ADN, notamment la richesse en nutriments (Balke et Gralla 1987, Reyes-Dominguez, et al. 2003), la concentration en oxygène (Ni Bhriain, Dorman et Higgins 1989), la température (Goldstein et Drlica 1984), le pH (Karem et Foster 1993), le stress oxydatif (Weinstein-Fischer, Elgrably-Weiss et Altuvia 2000), et le stress osmotique (Higgins, et al. 1988). Ces changements transitoires de superhélicité conduisent à des modifications des taux de transcription au niveau du génome entier (Jovanovich et Lebowitz 1987, Pruss et Drlica

1989, Gmuender, et al. 2001). De plus, un niveau adéquat de la superhélicité de l'ADN est indispensable pour tous les processus cellulaires vitaux : la réplication, la réparation de l'ADN, la transcription, la recombinaison et la transposition. Le contrôle du niveau de topologie de l'ADN est le résultat de la combinaison de deux catégories de protéines : les topoisomérases (Champoux 2001, Rui et Tse-Dinh 2003), et les protéines de type histone (Dorman et Deighan 2003). Les modifications de topologie de l'ADN sont reliées à l'expression globale des gènes chez les microorganismes et également détectées in vivo (Dorman et Corcoran 2009, Gmuender, et al. 2001, Ferrandiz, et al. 2010, Ye, et al. 2007).

2.5.9.1. Les topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes conservées chez tous les organismes vivants (Champoux 2001). Il existe deux types de topoisomérases, I (subdivisés en IA et IB) et II. Il n'existe pas de topoisomérase III chez les bactéries.

Les topoisomérases de type II clivent les deux brins de la double hélice d'ADN et transfèrent une double hélice d'ADN à travers la coupure (Levine, Hiasa et Marians 1998). Elles possèdent des activités diverses de relâchement, de caténation/décaténation, et d'introduction ou de suppression de nœuds. Parmi toutes les topoisomérases, l'ADN gyrase (de type II) est la seule capable d'introduire des super tours négatifs dans l'ADN. Cette activité nécessite l'hydrolyse d'ATP.

Les topoisomérases de type II sont les cibles de deux familles d'antibiotiques : les coumarines et les quinolones (Drlica et Zhao 1997, Drlica, Hiasa, et al. 2009). Les coumarines entrent en compétition avec l'ATP. Les quinolones se fixent sur l'enzyme complexée à l'ADN et l'immobilisent sur l'ADN après coupure. Ceci entraîne la fragmentation de l'ADN, aboutissant à la mort cellulaire (Griffin, et al. 2010). Chez *L. pneumophila*, l'analyse des génomes confirme la présence de gènes codant trois topoisomérase différentes : la topoisomérase I (TopoI), codée par le gène topA, de type IA ; l'ADN gyrase, codée par les

gènes *gyrA* et *gyrB*, de type II ; et la topoisomérase IV (TopoIV), codée par les gènes *parC* et *parE*, de type II (Cazalet, Rusniok, et al. 2004).

Le niveau adéquat de superhélicité de l'ADN est réalisé par les activités opposées d'une part de la Topo I et de la Topo IV qui relâchent la superhélicité de l'ADN et d'autre part de l'ADN gyrase qui introduit des supertours négatifs dans l'ADN (Zechiedrich, Khodursky et Bachellier, et al. 2000).

L'ADN gyrase est essentielle à l'initiation de la réplication de l'ADN et de la transcription car elle permet d'abaisser la quantité d'énergie nécessaire à l'ouverture de la double hélice (Espeli et Marians 2004). La TopoIV est responsable de la décaténation de l'ADN au cours de la réplication (Hiasa et Marians 1996), mais aussi lors des processus de recombinaison spécifique de site (Zechiedrich, Khodursky et Cozzarelli 1997).

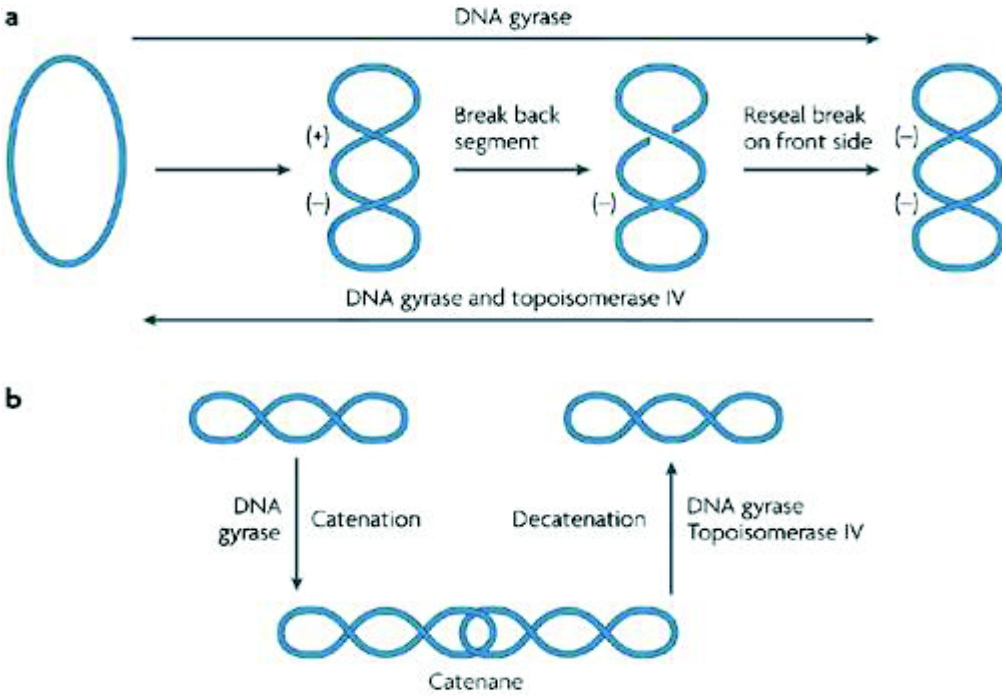


Figure 9 : régulation de la topologie de l'ADN

http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n1/images/nrd2202-f3.jpg.

2.5.9.2. Les protéines de type histone (PTH)

Appelées NAP (Nuclear Associated Protein), trois études ont tenté de définir le lien potentiel entre ces protéines et la virulence, mais leurs conclusions sont incomplètes (Park, et al. 2006, Morash, et al. 2009, Yu, et al. 2009). Les différents rôles des PTH sont liés à leurs propriétés de liaison à l'ADN. Chacune des histones est impliquée dans la régulation globale de l'expression des gènes (Kar, Edgar et Adhya 2005, Mangan, et al. 2006). Le type de gènes affectés par le degré de superhélicité de l'ADN est extrêmement diversifié et permet aux bactéries de s'adapter au stress. Ils sont responsables de trois fonctions basiques dans les cellules bactériennes : elles constituent des régulateurs globaux de la transcription de centaines de gènes (Dorman et Deighan 2003) ; elles interviennent dans le contrôle de l'état de superenroulement du chromosome, soit directement par fixation sur l'ADN (Luijsterburg, et al. 2006) soit indirectement par régulation des gènes codant les topoisomérases (Schneider, et al. 1999, Weinstein-Fischer, Elgrably-Weiss et Altuvia 2000, Keane et Dorman 2003); elles structurent le chromosome de façon globale en micro- et macro-domaines (Valens, et al. 2004, Hardy et Cozzarelli 2005). Chez *E. coli* et la majorité des bactéries, il y a 5 PTH majeures : Dps, Fis, H-NS, HU et IHF.

3. Les infections humaines dues aux bactéries du genre *Legionella*

Les infections par les bactéries de genre *Legionella* se manifestent sous deux formes cliniques distinctes : la maladie des Légionnaires ou légionellose et la fièvre de Pontiac. Plus rarement, des manifestations cliniques extra pulmonaires sont décrites.

La légionellose ou maladie des légionnaires est la deuxième cause de pneumonies bactériennes graves après *Streptococcus pneumoniae.* L'apparition de tests chromatographiques permettant un diagnostic rapide et sensible de la légionellose par détection de l'antigène urinaire de *L. pneumophilia* de sérogroupe1 a largement favorisé la caractérisation de l'incidence et de l'épidémiologie de cette maladie. Une méta-analyse

compilant 41 études concernant les pneumonies communautaires a permis de mettre en cause les bactéries du genre *Legionella* chez 1.9 % des patients ambulatoires, 4.9% des patients hospitalisés et 9.7% des patients admis en réanimation (Woodhead 2002). L'augmentation d'incidence des cas de légionellose dans les pays industrialisés au cours des dernières décennies est liée à une meilleure reconnaissance et détection de la maladie, mais pourrait être également liée aux modifications environnementales apportées par l'Homme (Fields, Benson et Besser 2002). En particulier, les systèmes modernes d'adduction d'eau et de climatisation favorisent la prolifération des *Legionella* et sont générateurs d'aérosols contaminés à l'origine des infections humaines, alors que ces aérosols infectieux sont rares dans la nature.

3.1. Aspects cliniques

3.1.1. La fièvre de Pontiac:

La première épidémie caractérisée de fièvre de Pontiac a concerné 144 travailleurs et visiteurs d'un centre médical à Pontiac, dans le Michigan (USA), en 1968 (Glick, et al. 1978). L'âge, le sexe et le tabagisme ne représentent pas des facteurs de risque pour cette maladie (Friedman et al 1987). La fièvre de Pontiac est une forme bénigne d'infection par *Legionella*. Le taux d'attaque est élevé allant jusqu'à 95%. Elle affecte surtout les adultes, mais des cas ont été rapportés chez les enfants. Plusieurs études ont fait l'objet d'une définition stricte de la fièvre de Pontiac basée sur des critères cliniques et environnementaux (Burnsed, et al. 2007). Les symptômes cliniques apparaissent entre 3 à 8 jours après la contamination (Tossa et al 2006). Des signes «cliniques» correspondant à un syndrome pseudo-grippal (fièvre, asthénie, myalgies, arthralgies, céphalées, toux, nausées et maux de gorge) peuvent être associés à d'autres symptômes, tels que la dyspnée, des vomissements, des douleurs thoraciques ou abdominales, une rhinorrhée, des vertiges ou encore de la diarrhée. Ces symptômes durent généralement entre 2 et 5 jours. La guérison survient spontanément, sans prescription d'antibiotiques (Tossa et al 2006). Le manque de spécificité des manifestations cliniques et leur évolution spontanément favorable expliquent que l'incidence de la fièvre de Pontiac est

sous-évaluée. Les critères environnementaux se limitent à la détection d'une concentration de *Legionella* égale ou supérieure à 10^4 bactéries L^{-1} d'eau prélevée au sein de la source de contamination (Tossa et al 2006). Cette forme peut être causée par *L. pneumophila* (Kaufmann, et al. 1981, Palusinska-Szysz et Cendrowska-Pinkosz 2009) mais aussi par d'autres espèces, telles que *L. anisa* (Fenstersheib, et al. 1990)*, L. feeleii* (Herwaldt, et al. 1984)*, L. micdadei* (Goldberg, et al. 1989).

3.1.2. La maladie des légionnaires ou légionellose :

La légionellose est une pneumopathie atypique aiguë, souvent sévère. La durée d'incubation est de 2 à 14 jours. Le taux d'attaque de la légionellose est plus faible que celui de la fièvre de pontiac (0.1 à 5 % en 2009 en France, selon selon l'InVS). Le début de la maladie se manifeste par un état fébrile, parfois des symptômes gastro-intestinaux et neurologiques, un malaise. Les symptômes habituels combinent ensuite une fièvre supérieure à 39°C (Fernandez-Sabe et al 2003), une toux souvent non productive, des douleurs pleurétiques, des signes radiologiques atypiques comme des infiltrations mal limitées, hétérogènes, voire des épanchements pleuraux, des abcès pulmonaires. Quelques modifications biologiques ont été notées, telles que l'hyponatrémie et l'augmentation des transaminases hépatiques sériques. Une étude rapporte que l'hypophosphatémie est évocatrice du diagnostic (Cunha 2006). Une autre étude récente suggère qu'un ratio CRP/PCT (Procalcitonine) <0.5 est plutôt en faveur d'une infection à *Streptococcus pneumoniae* alors qu'un ratio > 1.25 reflète plutôt une infection à *Legionella* (Bellmann-Weiler, et al. 2010).

Le taux de mortalité varie entre 5 et 25% chez les patients immunocompétents (Mykietiuk, et al. 2005, (Jespersen, et al. 2010), 33% dans les formes sévères (Gacouin, et al. 2002), En France il est estimé à 11% (Campese, et al. 2011). Il dépend du terrain préalable du patient (B. Diederen 2008, Mulazimoglu et Yu 2001) et de la rapidité du diagnostic et d'instauration du traitement adapté (Lettinga, Verbon, et al.2002, Gacouin, Le Tulzo, et al. 2002).

Cette pneumonie est d'origine communautaire dans 80% des cas (Braun et al 2004) ou nosocomiale (Ozerol et al 2006). Le CNR (Centre National de Référence, Lyon, France) des *Legionelles* a mis en évidence plusieurs types de cas de légionellose: les cas sporadiques correspondent à des cas isolés causés par un génotype unique; les cas épidémiques correspondent à plusieurs cas causés par un génotype unique et survenant dans la même zone géographique au cours d'une période de temps relativement courte; et les cas endémiques correspondent à plusieurs cas causés par un génotype unique et non reliés entre eux.

Plusieurs cas fatals chez les patients immunodéprimés ont été signalés lors d'infections mixtes avec les micro-organismes suivants : *Streptococcus pneumonie, Prevotella intermedia, Enterococcus faecium, Enterobacter cloacae, Streptococcus pyogenes, Listeria monocytogenes, Nocardia sp., Cytomégalovirus* (Roig, Domingo et Morera 1994).

Lors d'une épidémie en Hollande en 1999, certains patients atteint de pneumonie aigue ont présenté des signes chroniques persistant un an et demi, notamment une fatigue chronique (75%), des symptômes neurologiques (66%) et neuromusculaires (63%) (Lettinga, Verbon, et al.2002). Des cas communautaires et nosocomiaux de légionellose sont rencontrés chez les enfants immunodéprimés, le plus souvent traités en service d'onco-hématologie (Brady 1989, Green, et al. 1996). Une épidémie dans une unité de néonatalogie a été décrite en 2009 (UfSaCoC 2009). Une réinfection d'un patient par la même souche de *L. pneumophila* a été documentée par électrophorèse en champs pulsé, ainsi que la réactivation probable d'un foyer d'infection à *L. pneumophila* chez un malade immunodéprimé (Leverstein-van Hall, et al. 1994). Mireia Coscolla et al. (Coscollá, et al. 2013), ont étudié une épidémie en Espagne et ont suggéré la possibilité d'une contamination par plusieurs souches de *Legionella* chez un même patient détectée par un profil ST mixte avec polymorphisme dans quelques positions.

En Espagne, une étude de cas communutaires sporadiques de legionellose hospitalisés pendants une période de 15 ans (1995-2010) a montré que la légionellose représentait 5.4% de cas de pneumonies communutaires, avec un taux de mortalité de 6.1% des cas. L'age

moyenne des patients atteints de légionellose était de 58.2 ans et 75% des patients étaient des hommes. Le nombre annuel de cas de *L. pneumophila* est resté stable sur la période d'étude. Au cours des dernières années, il y a eu cependant des modifications importantes dans le diagnostic et le traitement de la maladie, et le taux de létalité lié à *L. pneumophila* a diminué (Viasus et al, 2013).

3.1.3. Formes extra-pulmonaires

Le plus souvent suspectées initialement du fait d'une séroconversion en anticorps anti *Legionella*, les localisations bactériennes extra-pulmonaires peuvent s'associer ou non à une pneumonie. Les formes graves conduisent souvent au décès des patients (Palusinska-Szysz et Cendrowska-Pinkosz 2009) en affectant de nombreux organes. On observe notamment des atteintes neurologiques : encéphalite, neuropathie périphérique, myélite aigue, abcès cérébraux (Anderson et Sogaard 1987). Certaines études suggèrent un mécanisme toxinique (Wong, et al. 1979). Un mécanisme auto-immun a également été proposé sur la base de quelques cas d'encéphalomyélites aigues disséminées ou d'ataxies cérébelleuses aigues post infectieuses survenant quelques semaines après la guérison de la pneumonie (de Lau, et al. 2010, Sommer, Eurbguth et Neudorfer 2000). D'autres manifestations extra-pulmonaires ont été décrtites comme des atteintes cardiaques (myocardite, péricardite ou endocardite), oculaires (rétinite), des tissus adipeux, du système digestif (péritonite, colite nécrosante, pancréatite), des reins, du système musculaire (rhabdomyolyse) (Megarbane, et al. 2000, McConkey, et al. 2006, Han, et al. 2010). L'atteinte rénale aiguë, les atteintes cutanées (de type cellulite, abcès), une coagulation intra vasculaire disséminée et l'insuffisance respiratoire sont les principaux facteurs conduisant au décès.

3.2. Modes de contamination :

La seule voie certaine de contamination humaine est l'inhalation d'aérosols formés à partir d'une eau contaminée, contenant des microgouttelettes de diamètre égale où inférieur à 5 µm

soit le diamètre des alvéoles pulmonaires (Cianciotto 2001). Les fausses routes pourraient être également une voie possible de contamination (Sabria et Yu 2002). La transmission peut survenir à partir de réservoirs hydriques naturels mais également à partir d'installations et réseaux d'eau développés par l'Homme, tels que les tours aéroréfrigérantes, les climatiseurs, les douches, les fontaines, etc. Les chiffres publiés par les autorités sanitaires révèlent une nette augmentation du nombre d'infections depuis 1996, liée principalement à une meilleure détection de la maladie, mais pouvant également s'expliquer en partie par la banalisation des systèmes de climatisation dans les bureaux d'entreprise mais aussi chez les particuliers. Il n'y a pas de contamination interhumaine, et donc il n'est pas nécessaire d'isoler les patients infectés.

3.3. Facteurs de risque

3.3.1. Facteurs de risque individuels :

Les facteurs de risque de légionellose contractés en communauté ou à l'occasion d'un voyage sont notamment: l'âge élevé, le sexe masculin, l'alcoolisme, le tabagisme, le diabète, l'immunodépression, les maladies pulmonaires chroniques (Palusinska-Szysz et Cendrowska-Pinkosz 2009, Neumann et al 2002).

Les facteurs de risque de pneumopathie nosocomiale sont : une chirurgie récente, une intubation trachéale, une ventilation assistée, une intubation nasogastrique et l'utilisation de dispositifs de traitement respiratoire. Les patients les plus sensibles sont notamment ceux présentant un déficit immunitaire (receveurs de greffe d'organe, patients sous corticothérapie au long cours, etc.), une insuffisance rénale sévère, une maladie cardiovasculaire (Campese, et al. 2011). Toutefois, la légionellose survient chez des sujets sains dans 17% des cas (Falguera et al 2001).

La réponse immunitaire chez l'hôte est influencée par des facteurs génétiques. Les études expérimentales chez la souris ont mis en évidence un locus (lgn1) codant une protéine de la

famille NOD appelé Naip5 (Neuronal apoptosois inhibitory protein 5), localisé sur le chromosome 13, et permettant une résistance à l'infection par *Legionella.*

Le développement intracellulaire des *Legionella* est influencé par le polymorphisme génétique des récepteurs Toll Like (TLR4, TLR5, TLR2) (Merex, et al. 2006, Hawn, et al. 2006). Une étude suggère une association entre le polymorphisme du TLR4 et une résistance à l'infection par *L. pneumophila* (Hawn, et al. 2003). Une étude cas / témoins effectuée lors d'une épidémie en Hollande en 1999 a montré qu'un polymorphisme du TLR5 était associé à une susceptibilité accrue aux pneumonies dues à *L. pneumophila* (Merex, et al. 2006).

3.3.2. Facteurs de risque collectifs :

Les patients exposés à un risque dit collectif sont ceux ayant séjourné dans des lieux où les réseaux d'eau sont susceptibles d'être contaminés par des *Legionella*. Les endroits les plus risqués sont les hôpitaux, les hôtels, les campings, les stations thermales, les tours aéroréfrigérantes qui diffusent des aérosols contaminés dans l'atmosphère parfois à plusieurs kilomètres, et tous les endroits avec des réseaux d'eau chaude sanitaire complexes, vétustes, mal conçus et/ou mal entretenus (présence de tartre, de sédiments, corrosion des matériaux).

Des cas sporadiques de légionellose sont signalés tout au long de l'année, mais la plupart des épidémies surviennent en été et en automne (Joseph et van der Sande 2006). Le jardinage, la manipulation de compost ou de tuyaux d'arrosage ont également été documentés comme facteurs de risque (Den Boer et al 2007, Piso, Caruso et Nebiker 2007). Des contacts avec des aérosols de *L. pneumophila* peuvent également survenir à partir de flaques d'eau de pluie sur les routes d'asphalte, surtout lorsque les températures sont élevées (Sakamoto et al 2009).

3.4. Epidémiologie de la légionellose en France et dans le monde

En France, la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987. Le nombre de cas déclarés a augmenté annuellement (25-30%) de 1989 (37 cas) à 2005 (1527 cas,

incidence de 2,5 cas / 100 000 habitants / an). Puis l'incidence a varié légèrement, avec 1428 cas en 2007, 1206 cas en 2009, 1540 cas en 2010, et 1298 cas en 2012.

3.4.1. Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2012 : (données InVs)

En 2012, parmi les 1298 cas de légionellose notifiés, 7 cas étaient des résidents dans les DOM-TOM et 34 des ressortissants étrangers. Le taux d'incidence des cas notifiés de légionellose en France métropolitaine était de 1,98/10^5. Il existait un gradient est-ouest, comme les années précédentes.

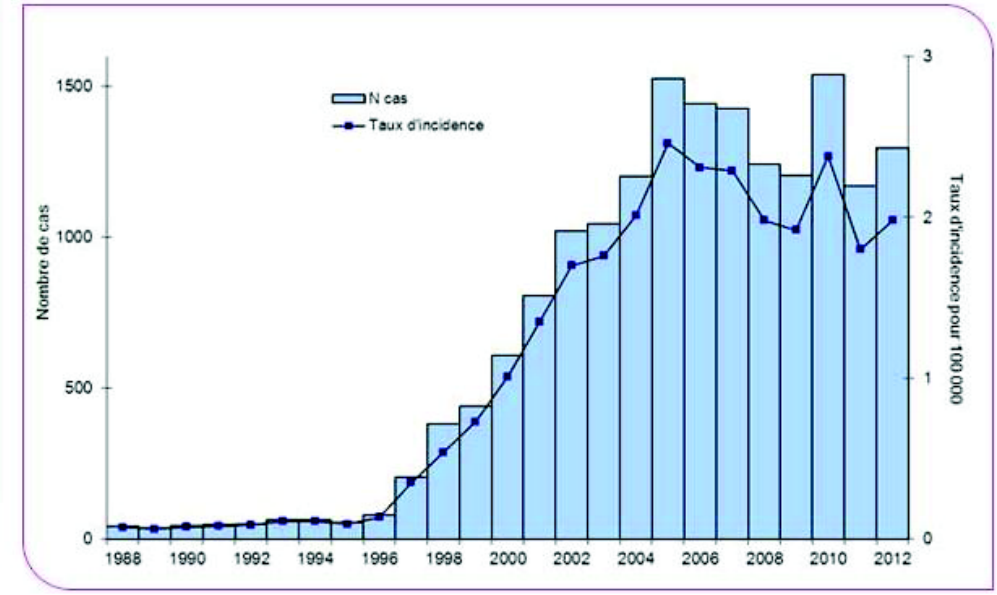


Figure 10 : Evolution du nombre de cas et du taux d'incidence des cas notifiés de légionellose, France, 1988 – 2012 (données InVs)

L'âge médian des cas était de 62 ans [Min 0 - Max 99 ans] et le sexe ratio homme/femme était de 2,9 (961 hommes et 337 femmes). Un seul cas avait été rapporté chez les moins de 15 ans. Il s'agissait d'un nourrisson diagnostiqué pour une légionellose à Lp3. L'incidence augmentait avec l'âge et les taux d'incidence les plus élevés s'observaient chez les personnes de plus de 80 ans (6,4/10^5). Seuls 13 cas n'avaient pas été hospitalisés (1 %).

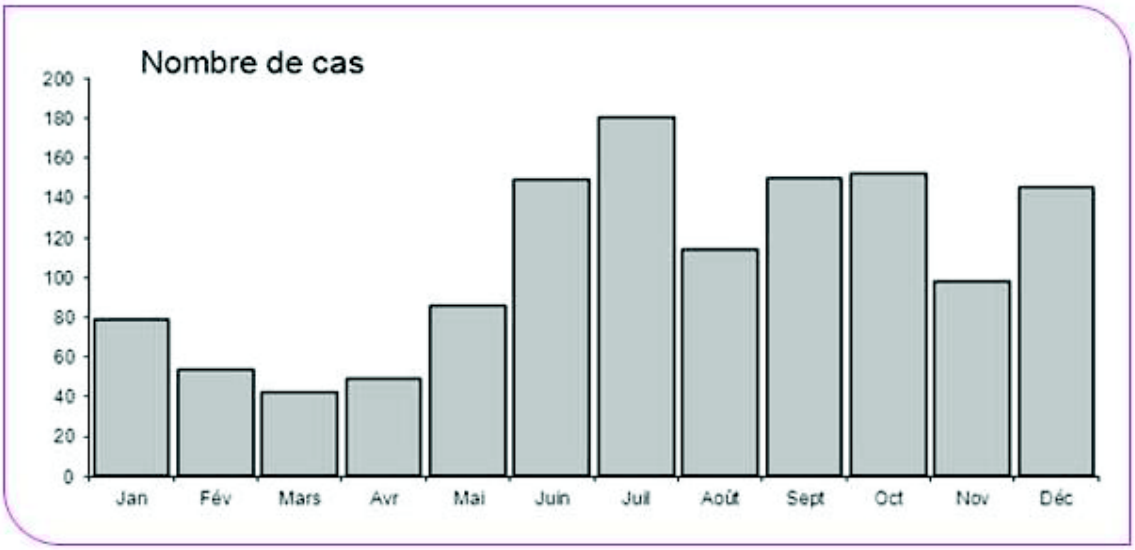


Figure 11 : Nombre mensuel de cas de légionellose selon la date des signes en France, 2012 (données InVs).

La majorité des cas était survenue au cours du second semestre, Distribution selon le mois de début des signes des cas de légionellose survenus

L'évolution de la maladie était connue pour 94 % des cas (1217/1297) et le taux de létalité était de 10,7 % (130 décès). Le délai médian entre la date des premiers signes cliniques et la date de notification à l'Agence régionale de santé (ARS) était de 6 jours (intervalle inter-quartile [4 ; 9]). Toutefois, 80 % des cas étaient notifiés dans les 10 jours suivant l'apparition des signes cliniques et 94 % dans les 20 jours. Parmi les 1298 cas notifiés, 1275 (98 %) étaient des cas confirmés. La détection des antigènes solubles urinaires était la principale méthode diagnostique utilisée (1245 cas); 96 % des cas étaient dus à *L. pneumophila* sérogroupe 1 (1262/1298). Une amplification génique (PCR) avait été réalisée pour 41 cas et pour 11 d'entre eux la PCR était l'unique méthode de diagnostic biologique. Pour 23,7 % des cas (n=307) une souche avait été isolée, pourcentage supérieur à celui de 2011 (22,5 %). La majorité (304/307) des souches étaient des souches de *L. pneumophila* dont 294 de sérogroupe 1 (Lp1) et 10 appartenant à d'autres sérogroupes. Toutes ces souches avaient été analysées par génotypage par le Centre national de référence des légionelles. Parmi les Lp1, 80 (27 %) étaient des souches endémiques : 30 étaient des souches «Louisa», 23 des souches «Lorraine» et 21 des souches «Paris» ; 96 souches présentaient un profil « sporadique » (non

encore répertorié dans la base de données du CNR). Pour 67 cas (23 %), la souche humaine avait pu être comparée aux souches environnementales isolées d'un lieu fréquenté par le malade, et pour 30 cas (45 %) les profils génomiques des souches étaient identiques. Pour ces cas, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que les réseaux d'eau sanitaires étaient la source la plus probable de contamination pour 7 hôpitaux, 12 domiciles, 5 établissements de tourisme et 3 autres établissements. Pour les 3 autres cas qui appartenaient à un même épisode de cas groupés, la source la plus probable était le circuit de refroidissement d'une tour aéroréfrigérante. Une exposition à risque lors de la période d'incubation était rapportée pour 500 cas (39 %). Parmi eux, 89 cas (7 % de l'ensemble des cas) avaient séjourné dans un établissement hospitalier pendant la période d'incubation dont 33 (37 %) étaient des cas nosocomiaux certains (hospitalisés durant toute la période supposée d'exposition). Le mode d'exposition principal était un voyage avec un séjour dans un établissement de tourisme pour 139 cas (11 % de l'ensemble).

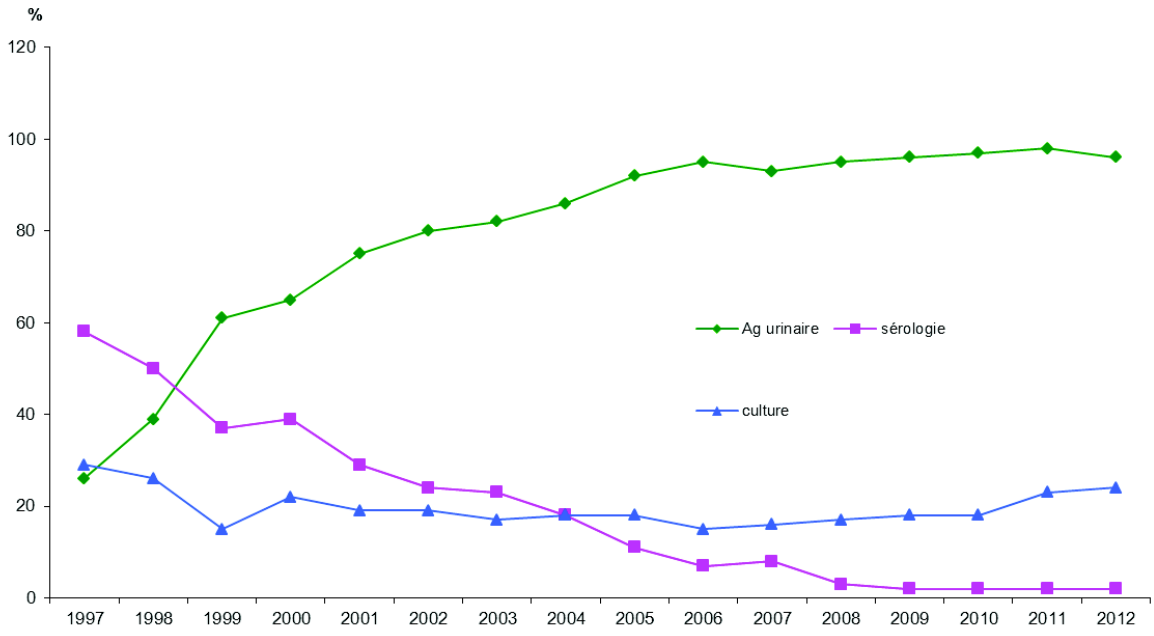


Figure 12 : Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1997-2012

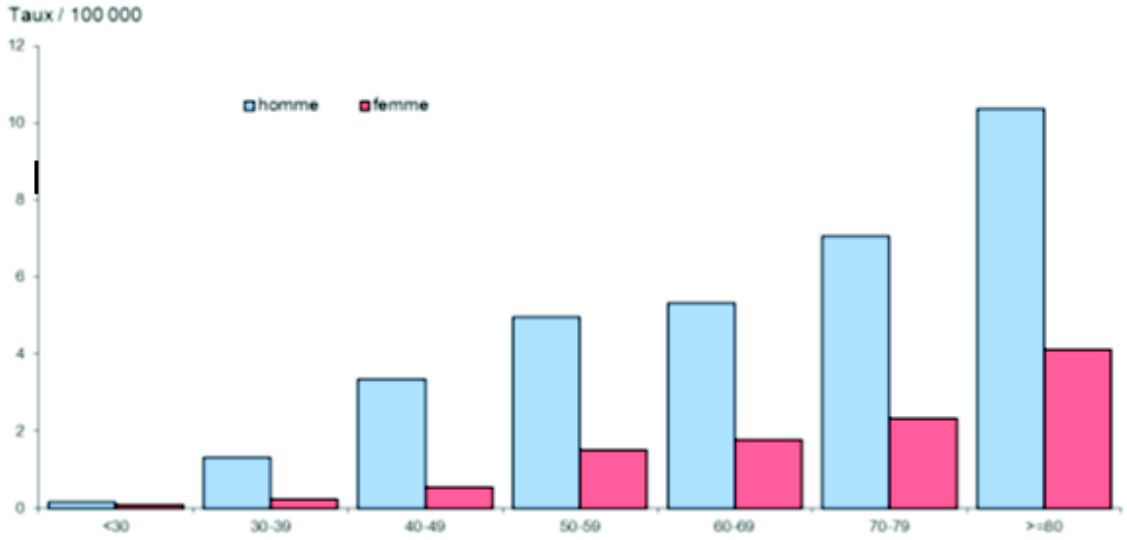


Figure 13 : Taux d'incidence des cas notifiés de légionellose selon l'âge et le sexe, France, 2012

Facteurs favorisants*	N	%
Cancer / hémopathie	139	11
Corticoïdes /immunosuppresseurs	136	11
Diabète	191	15
Tabagisme	583	45
Autres	239	18
Au moins un facteur	954	74

Figure 14 : Répartition des facteurs favorisants des cas de légionellose en France, 2012 (données InVs).

74 % des cas (954/1298) présentaient au moins un facteur de risque connu (tableau 1). Le tabagisme était le seul facteur de risque rapporté pour 29 % des cas.

Le réseau européen de surveillance des cas liés aux voyages «ELDSNet» a signalé à l'InVS 31 cas supplémentaires : il s'agissait de cas survenus chez des ressortissants étrangers ayant séjourné en France dans les 10 jours précédant la date de début des signes. En 2012, 190 établissements français ont été notifiés par ELDSNet dont 13 avaient accueilli au moins 2 cas

sur une période de deux ans, et pour 5 (38 %) d'entre eux, les prélèvements issus du réseau d'eau sanitaire et réalisés à l'occasion de l'investigation montraient la présence de légionelles au-dessus du seuil règlementaire.

Expositions*	2009 (1206 cas)		2010 (1540)		2011 (1170)		2012 (1298)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hôpital	98	8	110	7	71	6	89	7
Maison de retraite	60	5	45	3	49	4	55	4
Station thermale	7	<1	5	<1	6	<1	10	1
Voyage	228	19	284	18	240	21	243	19
Hôtel-camping	*144*	*12*	*161*	*10*	*143*	*12*	*139*	*11*
Résidence temporaire	*47*	*4*	*56*	*4*	*45*	*4*	*69*	*5*
Autres types de voyage**	*37*	*3*	*67*	*4*	*52*	*5*	*35*	*3*
Autres ***	69	5	84	6	64	5	103	8
Total des cas ayant au moins une exposition	**462**	**38**	**528**	**34**	**430**	**37**	**500**	**39**

Figure 15 : Expositions à risque parmi les cas de légionellose survenue en France, 2009-2012 (données InVs).

*** Rapportées au nombre total de cas**

**** Sans précision de lieu et type de logement**

***** Cas groupés, ERP, etc.**

En 2012, des investigations de cas groupés (moins de 10 cas) ont été réalisées par les ARS en collaboration avec les Cires. Parmi ces investigations, les circuits de refroidissements d'une tour aéroréfrigérante ont été identifiés comme la source la plus probable de contamination de 8 cas, 3 cas communautaires et 5 cas demeurant en maison de retraite située en région Ile de France. Les autres investigations de cas groupés n'ont pas permis d'identifier une source commune de contamination.

Pour savoir plus suivre le lien (http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Legionellose/Donnees/Bilan-des-cas-de-legionellose-survenus-en-France-en-2012#)

3.4.2. Caractéristiques épidémiologiques européennes

D'après le rapport de l'ECDC (Enropean Center for Diseases control and prevention, Surveillance Report-Legionnaires' disease in Europe- 2012), 5 852 cas de légionellose ont été rapportés en 2012, dont 5394 cas confirmés (92%) et 458 cas probable (8%). Parmi les 458 cas probables, 174 (38%) étaient rapportés en Allemagne. La Slovaquie, la Lettonie et la Finlande avaient une proportion importante de cas probables (100%, 67% and 60%, respectivement). L'incidence par million d'habitants était de 11.5 en 2012. La distribution des cas par mois a montré un pic d'incidence pendant les saisons chaudes, avec 57% cas rapports de Juin jusqu' à Octobre.

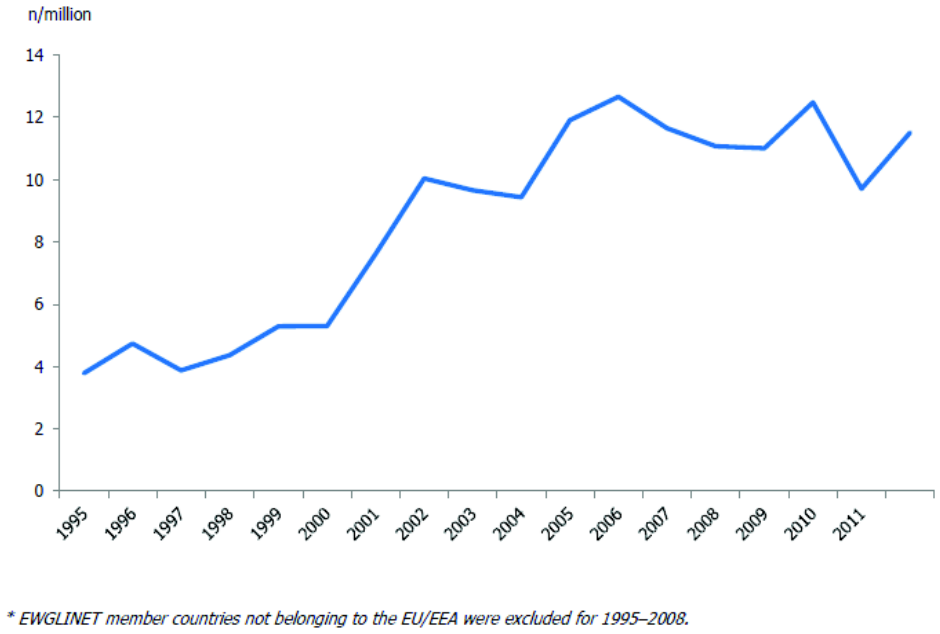


Figure 16 : l'incidence des cas de légionellose rapportés par an entre 1995-2012 (données ECDC).

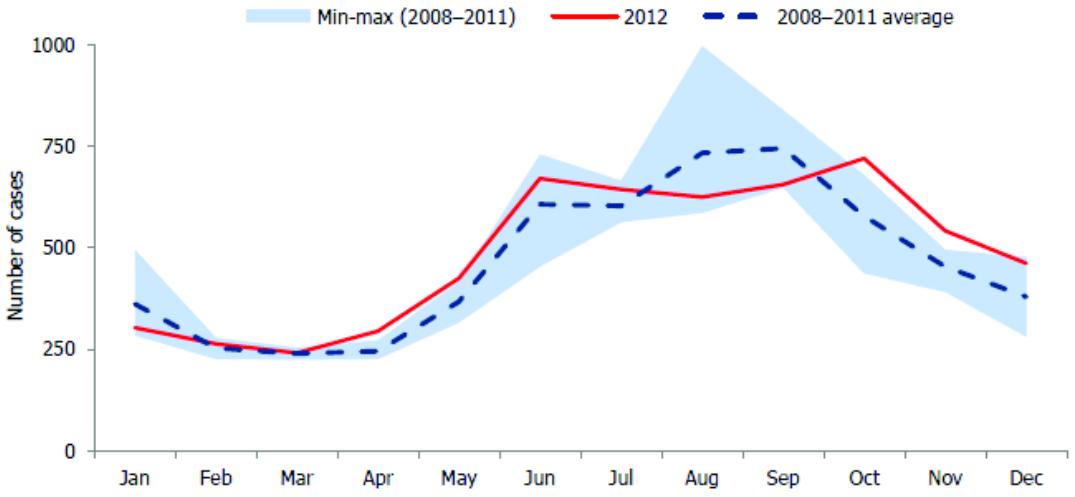


Figure 17 : les nombre de cas rapportés par mois entre 2008-2012 (données ECDC).

Country	Cases (n)	Population (n)	Notification rate (n/million)	Average difference between 2012 and 2008–11 rates (%)	Age-standardised notification rate (n/million)
Slovenia	82	2 055 496	39.9	53	37.7
Latvia	48	2 041 763	23.5	215	23.6
Denmark	127	5 580 516	22.8	-1	22.0
Italy	1 332	60 820 696	21.9	13	19.1
Spain	972	46 196 276	21.0	-11	20.2
France	1 298	65 327 724	19.9	-1	19.6
Netherlands	304	16 730 348	18.2	-12	17.6
Portugal	140	10 541 840	13.6	81	12.4
Austria	101	8 443 018	12.0	7	11.3
Sweden	102	9 482 855	10.8	-19	10.1
Malta	4	417 520	9.6	-28	9.3
Belgium	106	11 094 850	9.6	67	NA[a]
Luxembourg	5	524 853	9.5	-27	10.0
Cyprus	7	862 011	8.1	73	9.6
Germany	628	81 843 743	7.7	7	6.8
United Kingdom	401	62 989 551	6.4	12	6.3
Iceland	2	319 575	6.3	-43	6.6
Czech Republic	56	10 505 445	5.3	77	5.1
Norway	25	4 985 870	5.0	-37	5.1
Hungary	33	9 957 731	3.4	-29	3.2
Ireland	15	4 582 769	3.3	62	4.2
Lithuania	9	3 007 758	3.0	165	3.1
Greece	27	11 290 067	2.4	52	2.1
Estonia	3	1 339 571	2.2	-40	2.3
Finland	10	5 401 267	1.9	-44	1.8
Slovakia	4	5 404 322	0.7	-20	0.8
Poland	8	38 538 447	0.2	-58	0.2
Romania	3	21 355 849	0.1	34	0.1
Bulgaria	0	7 327 224	0.0	-100	0.0
EU/EEA total	**5 852**	**509 005 430**	**11.5**	**4**	**10.8**

[a] *Not applicable when information on age was not available for >5% of cases*

Figure 18 : l'incidence rapportée par les payes participantes en 2012 (données ECDC).

Den Boer et al ont suggéré dans leur étude publiée en 2013 de développer une méthode de typage moléculaire par micropuce contenant des marqueurs possédant une spécificité géographique afin de prédire l'origine des souches isolées des patients et de l'environnement. Pour la souche Lorraine ils ont identifié par exemple un marqueur de virulence codant pour une toxine de structure RtxA (Den Boer et al. 2013).

4. Le diagnostic

4.1. Diagnostic de la légionellose

4.1.1. Définition des cas de légionellose d'après l'InVS :

Les critères de déclaration consistent en une pneumopathie associée à au moins un des résultats suivants:

- Cas confirmé :
  - isolement de *Legionella* dans un prélèvement bronchique
  - et/ou augmentation du titre d'anticorps (x 4) avec un deuxième titre minimum de 128
  - et/ou présence d'antigène soluble urinaire
  - et/ou immunofluorescence directe positive.
- Cas probable : titre unique d'anticorps élevé.

Autres définitions :

- Cas nosocomial certain : malade hospitalisé durant la totalité de la période d'incubation (10 jours).
- Cas nosocomial probable : malade hospitalisé pendant une partie de la période d'incubation.
- Cas groupés liés au voyage : deux malades ou plus ayant séjourné dans un même établissement de tourisme dans une période de deux ans.

4.1.2. Anomalies biologiques non spécifiques :

Elles peuvent correspondre à une hyperleucocytose avec une formule inversée ou, plus rarement notamment au cours des formes sévères, une leucopénie et une thrombopénie, une atteinte rénale (protéinurie, hématurie, hyponatrémie et hypophosphatémie), et une atteinte hépatique (élévation de l'aspartate aminotransférase, des phosphates alcalines et de la lacticodéshydrogènase).

4.1.3. Tests bactériologiques spécifiques

4.1.3.1. Tests de détection antigénique urinaire :

La première mise au point de tests basés sur la détection de l'antigène urinaire de *L. pneumophila* sérogroupe 1 date de 1979 (Berdal, Farshy et Feeley 1979, Tilton 1979). C'est actuellement la méthode la plus utilisée pour le diagnostic de la légionellose (96 % des cas en 2009). L'antigène recherché dans les urines du patient est spécifique de l'espèce *L. pneumophila* et à son sérogroupe 1, et correspond au lipopolysaccharide (LPS) bactérien (Kohler, Zimmerman, et al. 1981). Plusieurs méthodes de détection ont été développées avec des sensibilités et spécificités comparables : radio-immunologique, l'anticorps secondaire étant radiomarqué; immuno-enzymatique, l'anticorps secondaire étant couplé à une enzyme dont l'activité pourra ensuite être détectée ; et immuno-chromatographique, basée sur la migration des anti-LPS marqués à l'or colloïdal.

Les tests basés sur la recherche d'antigènes urinaires de *L. pneumophila* sérogroupe 1 présentent une grande spécificité (plus de 99%) (Kashuba, Ballow et CH 1996), avec une valeur prédictive positive (VPP) de 86%, et une valeur prédictive négative (VPN) de 95%. Les variations de spécificité dépendent des kits commercialisés et les réactions croisées semblent être très exceptionnelles, telle que l'administration de sérum anti-lymphocytaire de lapin au décours d'une greffe rénale (Deforges et al 1999, Dominguez et al 2001, Yzerman, et al. 2002, Helbig, Uldum, et al. 2003). Il est recommandé de réchauffer les urines à 100 C°

pendant 5 minutes pour éliminer les protéines de l'échantillon et améliorer la réaction entre les anticorps de lapin et les anticorps anti-lapin utilisés dans les kits diagnostiques. La sensibilité varie de 56 % à plus de 90 % (Kashuba, Ballow et CH 1996). Ces différences sont liées aux facteurs suivants : (i) la proportion d'infections par *L. pneumophila* de sérogroupe 1 par rapport à celles liées aux autres sérogroupes et espèces du genre *Legionella* (Ruf, et al. 1990); (ii) la gravité clinique de la maladie, les cas graves présentant une meilleure détection (Yzerman, et al. 2002); (iii) l'utilisation d'urines concentrées ou non, la sensibilité étant nettement améliorée (70 à 88%) si les urines sont concentrées avant de réaliser le test (Blanco, et al. 2008, Guerrero, et al. 2004) ; (iv) le temps d'incubation du test pour les méthodes immuno-chromatographiques, la prolongation à une heure augmentant la sensibilité (Diederen et Peeters 2006, Diederen et al 2007).

Ces différences sont expliquées par le fait que ces tests mettent en évidence des souches reconnues par les anticorps monoclonaux Mab-3/1et Mab-2 qui ciblent principalement les cas communautaires de légionellose, notamment ceux liés aux voyages (Helbig, Bernander, et al. 2002, Yzerman, et al. 2002).

En France, deux tests immunoenzymatiques sont disponibles : Binax ® (EIA) et Biotest® (EIA) Les tests immunochromatographiques sont rapides (15 minutes) et simples d'exécution, d'où leur large diffusion dans les laboratoires de diagnostic (Dominguez et al 1998, Helbig et al 2001). Le premier kit disponible a été le Binax NOW *Legionella*®. Récemment, plusieurs kits permettant la détection d'antigènes urinaires de *L. pneumophila* de sérogroupe 1 ont été développés : Uni-Gold (Blanco, et al. 2008), Dipstick Eiken (Arai et al 2005) SAS *Legionella* (Diederen et al 2007), test SD bioline *Legionella* antigène test, rapid U *Legionella* antigène test (Diederen et Peeters 2006), et Barteles EIA (Guerrero, et al. 2004), Les performances de certains de ces nouveaux tests sont en dessous du niveau acceptable pour des tests diagnostiques.

Les tests urinaires offrent un diagnostic précoce, permettant l'administration rapide d'une antibiothérapie appropriée. Ces tests sont habituellement positifs en 1 à 3 jours après le début de la maladie et deviennent négatifs en 4 à 6 semaines. Chez une faible proportion de patients, ils demeurent positifs jusqu'à un an après l'infection (Kohler, Winn, et al. 1984, Sopena et al 2002). Cette durée est plus longue chez les patients immunodéprimés, qui sont habituellement fébriles plus longtemps (Sopena et al 2002), et le diagnostic reste possible même après l'administration d'une antibiothérapie adaptée.

Les tests actuels sont limités à la détection de *L. pneumophila* de sérogroupe 1. L'utilisation d'un nouvel antigène (PAL, peptidoglycan-associated lipoprotein) pour ce type de test pourrait permettre de détecter des bactéries du genre *Legionella* de sérogroupes 3, 4, 5 et 6, voire même d'autres espèces comme *L. micdadei*, *L. jordanis, L. oakridgensis, L. anisa, L. gormanii,* et *L. sainthelensi* (Kim, et al. 2003). Il n'existe pas de test urinaire commercialisé pour détecter *L. longbeachae.*

La limite majeure de ces tests est leur manque de sensibilité pour détecter les sérogroupes 2 à 15 de *L. pneumophila* et les autres espèces de ce genre, cette sensibilité variant de 14% à 69% (Benson, Tang et Fields 2000). La spécificité de ces tests est estimée à plus de 95% pour *L. pneumophila* sérogroupe 1. Des cas de faux positifs en test immunochromatographique (Binax NOW *Legionella*®) ont été rapportés sur des échantillons d'urines obtenus chez des patients ayant subi une transplantation rénale et reçu des anticorps de lapin anti-thymocytes (Deforges et al 1999). En France, selon l'InVS, le pourcentage de cas de légionellose diagnostiqués par recherche d'antigènes urinaires a augmenté de 26% en 1997 à 95% en 2008.

4.1.3.2. La culture

En 1977, la souche de *L. pneumophila* responsable de l'épidémie survenue à Philadelphie a été isolée en infectant des cobayes à partir de prélèvements pulmonaires collectés chez des patients décédés de légionellose. *L. pneumophila* a ensuite été cultivée sur des œufs embryonnés (McDade, Shepard, et al. 1977, McDade, Brenner et Bozeman 1979).

Plusieurs milieux acellulaires ont été ensuite développés : une gélose Mueller-Hinton enrichie avec 1% d'Isovitalex® et 1% d''hémoglobine (MH-IH) (Feeley, et al. 1979); une gélose contenant du charbon, de l'extrait de levures, de la L-cystéine et du pyrophosphate de fer (Feeley, et al. 1979), supplémenté plus tard par de l' α-cétoglutarate et des antibiotiques pour le rendre sélectif (Edelstein 1981, Pasculle et al 1980). Le BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) représente actuellement le milieu de référence, et contient les composants suivants : de l'extrait de levures à pH tamponné (10 g/L), du charbon actif (2 g/L), de l'agar (17 g/L), du tampon ACES (acide N2-acétamido-amino-éthano-sulfonique/hydroxyde de potassium à (15g/L), de la L-cystéine (0,4 g/L), du pyrophosphate ferrique soluble (0,25 g/L), et de l'α-cétoglutarate (1 g/L). Le milieu est tamponné à pH 6.9 par du tampon ACES. Le charbon actif permet de capturer les radicaux libres toxiques générés lors de l'autoclavage du milieu. L'extrait de levure a un rôle de facteur de croissance. L'ajout d'antibiotiques permet d'inhiber la croissance de la flore endogène humaine (Edelstein 1981).

Le milieu BMPAα contient du céfamandole, de la polymixine B, de l'anisomycine, du tampon ACES et de l'α-cetoglutarate ; il a été proposé par Aldestein en 1981 (Edelstein 1981). Celui-ci a également proposé un milieu sélectif nommé MWY (Edelstein, Snitzer et Bridge 1982, Wadowsky et Yee 1981). Le modèle de co-culture des *Legionella* en amibes a permis de découvrir la majorité des LLAP (T. Rowbotham 1980, Vandenesch, et al. 1990). Cette méthode est recommandée actuellement chez les patient suspects de légionellose et pour lesquels les cultures classiques sont négatives (La Scola, Mezi, et al. 2001) ou lorsque les échantillons cliniques sont fortement contaminés par la flore commensale.

Sur milieu gélosé BCYE les *Legionella* poussent sous forme de colonies grisâtres, mucoïdes, de taille variable, en « verre brisé » à la loupe binoculaire. Certaines espèces de *Legionella* poussent très lentement et nécessitent jusqu'à 10 jours d'incubation des cultures (Taylor et Albrecht 1995). L'ajout d'albumine au BCYE peut être nécessaire pour obtenir la croissance d'espèces comme *L. micdadei* et *L. bozemanii* (Morrill, et al. 1990). La persistance de

cultures positives à *Legionella* chez des patients présentant une légionellose traitée a été décrite (Tan, et al. 2001). Quelques espèces de *Legionella* émettent une fluorescence bleue ou jaune-vert lorsque les colonies sont exposées à des longueurs d'onde élevées (366nm). D'autres espèces comme *L. rubrilecens, L. taurinensis, L. dresdenensis* présentent une coloration rouge (luck, et al. 2009).

L'isolement en culture d'une souche de *Legionella*, du fait de sa spécificité proche de 100%, demeure la méthode de référence pour le diagnostic de la légionellose. Cependant, sa sensibilité varie de 25 à 80% en fonction du niveau d'expertise du laboratoire (Hoge et Breiman 1991). Cette culture demeure fastidieuse et l'isolement des *Legionella* nécessite 3 à 5 jours d'incubation des cultures voire plus. L'isolement d'une souche de *Legionella* ne représente environ que 20% des cas de légionellose diagnostiqués en Europe, et entre 15 et 29% des cas en France entre 1997 et 2008 d'après l'InVS.

L'isolement des *Legionella* peut être réalisé en théorie à partir de tout type de prélèvement clinique, mais il est habituellement obtenu à partir d'un prélèvement respiratoire : une expectoration, une aspiration trachéale ou bronchique, un lavage broncho-alvéolaire ou du liquide pleural. Cependant, seuls 25-78% des patients atteints de légionellose peuvent produire une expectoration (Edlestein, Meyer et Finegold 1980, Sopena, Sabrià-Leal, et al. 1998). Les critères classiques de rejet des échantillons respiratoires (nombreuses cellules épithéliales buccales et faible nombre de leucocytes) ne s'appliquent pas pour la culture des *Legionella* (Ingram et Plouffe 1994). La bactérie est parfois isolée d'une hémoculture. Un repiquage systématique des hémocultures lors d'une légionellose peut favoriser cet isolement (Rihs, et al. 1985). A noter que les *Legionella* sont mal colorées par la technique de Gram et ne sont habituellement pas visibles sur un frottis réalisé à partir d'un prélèvement respiratoire. La technique de Gimenez est mieux adaptée pour colorer ces bactéries. Pour les formes extra pulmonaires, l'isolement d'une souche de *Legionella* a été rapportée à partir d'échantillons

de localisation cardiaque (liquide péricardique, endocardite, myocardite) (de Lassence, et al. 1994), digestive, rénale cutanée (Sire, Staub et D 1994) et articulaire (Bemer, et al. 2002).

4.1.3.3. Diagnostic sérologique

La recherche d'anticorps anti-*Legionella* par immunofluorescence indirecte, IFI ou IFAT (Indirect Fluorescent Anti body Test), a été mise au point par le CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) au cours de l'épidémie de Philadelphie. La CDC a utilisé initialement des bactéries ayant cultivées sur sac vitellin, puis des bactéries cultivées 48 h sur milieu gélosé et inactivée à 100 C° pendant 1 heure, l'antigène obtenu étant ensuite dilué dans une suspension de sac vitellin (Wilkinson, Reingold, et al. 1983). Cette méthode a été utilisée en routine avant la commercialisation des tests urinaires. Ce test détecte principalement les anticorps anti-LPS de *Legionella*.

Différents tests de type ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay) sont actuellement proposés comme méthode de screening pour la détection des anticorps anti-*L. pneumophila* le plus souvent de sérogroupes 1 à 7. Ces tests montrent une bonne corrélation avec les résultats de l'IFI (Nguyen, Matsiota-Bernard et C 1995, Bangsborg, et al. 1994).

Ces méthodes sérologiques sont actuellement moins utilisées. En France, le pourcentage de cas de légionellose diagnostiqués par sérologie est passé de 58 % en 1997 à 3 % en 2008, et 2% en 2010 (Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose en France entre1996 et 2012 source InVS). En effet, si les tests sérologiques représentent des outils épidémiologiques très intéressants, ils ont peu d'impact sur la prise en charge des patients car ils deviennent positifs tardivement, en moyenne 2 à 3 semaines après infection. De plus, de nombreux patients anciennement infectés par *L. pneumophila* gardent des titres anticorps résiduels parfois élevés (Plouffe et al 1995). Des anticorps sont détectables jusqu'à 2 ans après l'infection chez 20 % des patients (Kallings et Nordstrom 1983). De nombreuses réactions sérologiques croisées ont été décrites pour les différentes espèces du genre

Legionella ce qui rend difficile la détermination de l'espèce et du sérogroupe en cause (Wilkinson, Reingold, et al. 1983). Des réactions croisées existent également avec d'autres bactéries, principalement *Pseudomonas aeruginosa* et *Coxiella burnetii* (agent de la fièvre Q), et plus rarement avec *Pseudomonas pseudomallei*, *Bacteroides fragilis, Campylobacter, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia psittaci, Citrobacter freundii, Haemophilus influenzae, Rickettsia typhi et Proteus vulgaris* (Wang, et al. 1987, Boldur, et al. 1991, G. Klein 1980, Collins, et al. 1984).

Répartition des méthodes de diagnostic* des cas légionelloses, France, 1996 - 2012

	1996		1997		1998		1999		2000		2001		2002		2003	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Nombre de cas	80		206		381		440		610		807		1021		1044	
Culture	29	36	60	29	98	26	68	16	134	22	157	20	195	19	173	17
Sérologie			119	58	189	50	161	37	235	39	237	29	250	25	240	23
Antigène urinaire			53	26	148	39	267	61	396	65	602	74	820	80	858	82

	2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Nombre de cas	1527		1443		1428		1244		1206		1540		1170		1298	
Culture	276	18	220	15	231	16	213	17	220	18	282	18	263	22	307	24
Sérologie	163	11	100	7	92	6	40	3	29	2	37	2	24	2	19	2
Antigène urinaire	1412	92	1362	95	1325	95	1187	95	1158	96	1488	97	1130	97	1245	96

* un cas peut être diagnostiqué par plusieurs méthodes
Source : données de la déclaration obligatoire

Figure 19 : répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionelloses, France , 1996-2012.

La sensibilité de la sérologie pour le diagnostic de légionellose varie suivant les études de 40 à 75 %. Ces variations peuvent être dues aux différents types de préparations antigéniques, à la souche de référence utilisée lors de la préparation des antigènes, à la valence (mono ou polyvalence) des antigènes utilisés, aux classes d'immunoglobulines (IgG, IgM IgA) détectées (Boshuizen, Den Boer, et al. 2003), aux populations étudiées, aux réactions croisées. Les anticorps apparaissent chez environ 80% des patients dans deux à trois semaines, mais il existe quelques patients qui développent des anticorps en phase précoce, le pic étant atteint environ quatre à cinq semaines après le début de l'infection. Des séroconversions tardives apparaissant après 2 mois ou plus sont rapportées, chez plusieurs cas

confirmés la séroconversion n'apparaissant jamais. Les anticorps restent détectables entre 2 à 3 mois et jusqu'à 12-18 mois et jusqu'à 48 mois après l'infection chez un tiers des patients. Ces données expliquent que des titres élevés mais stables chez un patient présentant une pneumonie peuvent correspondre à une légionellose ancienne. L'élévation du titre des IgM peut suggérer une affection récente (Zimmerman, et al. 1982), mais ces anticorps peuvent être absents (Hartigan 1981). Au contraire, les anticorps de type IgM peuvent persister plus d'un an chez certains patients. Les études de prévalence d'anticorps dans la population de volontaires sains montrent que des taux faibles d'anticorps anti-*Legionella sp.* Peuvent être détectés (Bornstein, et al. 1987, Helms, Johnson, et al. 1980, Helms, Renner, et al. 1980, Smalley et Ourth 1981). Des taux d'anticorps de 1/32 s'observent chez 2,5 % des personnes pour *L. pneumophila* sérogroupe 1 et 1,5 % pour les autres sérogroupes. Des titres plus élevés peuvent s'observer pour les autres espèces de *Legionella*, mais demeurent inférieurs à 256. Des titres faibles ont également été détectés chez des donneurs de sang ou des patients vus en consultation ou hospitalisés (Klein, Jones et Feeley 1979, Franzin et Scramuzza 1995). Quelques cas de séroconversion ont été décrits chez des patients transplantés sans aucune symptomatologie en rapport avec un tableau de légionellose (Boshuizen, Neppelenbroek, et al. 2001).

Pour un titre élevé unique ou répété, la sensibilité est faible (10 %) avec une VPP extrêmement basse de 15 %. Le titre de 256 pour un sérum unique est utilisé pour déclarer un cas de légionellose présomptif durant une épidémie; son interprétation est beaucoup plus délicate en présence d'un cas sporadique. Finalement cette méthode actuellement ne permet qu'un diagnostic tardif voire rétrospectif. Le mieux est d'obtenir une multiplication par 4 du taux initial.

4.1.3.4. Tests basés sur la détection des acides nucléiques des *Legionella*

Le premier test moléculaire développé pour le diagnostic de la légionellose était basé sur la détection de l'ADN de toutes les espèces de *Legionella* par utilisation d'une sonde spécifique de genre. Cette approche manque de spécificité, mais est toujours utilisée actuellement pour la détection des bactéries du genre *Legionella* dans l'environnement (Joseph CA 2007). La technique de PCR en temps réel permet actuellement d'obtenir un résultat plus rapide et fiable, sans nécessité d'une étape post-PCR. La PCR comme outil de diagnostic cible principalement des régions spécifiques des gènes codant l'ARNr 16S (Templeton, Scheltinga et Sillekens 2003, Stolhaug et Bergh 2006), la région intergénique des ARNr 5S et 23S (Herpers, et al. 2003), le gène codant l'ARNr 5S (Kessler, et al. 1993) ou le gène mip codant un facteur de virulence (macrophage inhibition potentiator) pour les techniques spécifiques de l'espèce *L. pneumophila* (Stolhaug et Bergh 2006, Ratcliff, et al. 1998). Les prélèvements testés sont généralement les sécrétions des voies respiratoires inférieures (expectorations, lavages broncho-alvéolaires, aspirations trachéales, broncho-aspirations nasopharyngées), mais aussi du sang total, des cellules mononuclées, du sérum et des urines (Ramirez, Ahkee, et al. 1996, Murdoch et Chambers 2000). La sensibilité de ces tests peut varier de 11 à près de 100%. De nombreuses publications ont rapporté des spécificités inférieures à 99% (Graves 1980). Les performances de la PCR en terme de sensibilité sont très dépendantes du type d'échantillon (prélèvements respiratoires, urines, sérums) et de l'ancienneté des études. L'amélioration des techniques d'extraction et de purification d'ADN a permis d'augmenter la sensibilité de la PCR (D. Wilson, et al. 2003). Les kits d'extraction d'ADN qui donnent les meilleurs résultats sur les expectorations et les lavages broncho alvéolaires sont les kits Mag NA Pure® (Roche Diagnostics) (Decludt, et al. 1999) et Nuclisens ® (BioMérieux) pour les méthodes automatisées et le kit HighPure PCR Template préparation kit® (Roche Diagnostics) pour les méthodes manuelles (Decludt, et al. 1999) (D. Wilson, et al. 2004). La présence possible d'inhibiteurs de PCR pouvant conduire à des résultats faussement négatifs

et le risque de contamination exogène des échantillons cliniques pouvant conduire à des faux positifs représentent les inconvénients majeurs de ces méthodes.

Une étude récente concernant l'impact de l'utilisation systématique de ces tests sur le diagnostic de la legionellose a montré que l'incidence de cette maladie est plus élevée que celle reconnue jusqu'à présent. L'utilisation des tests de PCR en routine fournit des résultats rapides et permet une meilleure caractérisation de l'épidémiologie régionale de maladie (Murdoch, et al. 2013).

PCR sur prélèvement pulmonaires

De nombreux auteurs ont testé la PCR *Legionella* en point final ou en temps réel sur les prélèvements pulmonaires de type lavages broncho-alvéolaires (LBA), aspirations trachéo-bronchiques, crachats, écouvillons de gorge, biopsie pulmonaires etc. Plusieurs études montrent une sensibilité de détection de *L. pneumophila* dans les prélèvements respiratoires égale ou supérieure à celle de la culture (Murdoch et Chambers 2000, D. Wilson, et al. 2003). La PCR est donc considérée comme une méthode de choix pour les patients qui produisent des expectorations (Decludt, et al. 1999). Une étude publiée en 2006 montrait que la PCR *Legionella* sur les prélèvements respiratoires étaient positives chez 84.6% des 13 patient ayant une recherchée d'antigène urinaire positive (M. Koide, F. Higa, et al. 2006). Les études évaluant les performances de la PCR *Legionella* sur prélèvements respiratoires par rapport aux performances des tests de détection de l'antigène urinaire sont rares mais ont montré que la sensibilité de la PCR est similaire ou plus faible que les tests de détection de l'antigène urinaire (M. Koide, et al. 2004). La technique de PCR quantitative en temps réel montre que, pour les patients avec plusieurs prélèvements pulmonaires réalisés, le taux de bactéries est significativement inferieur (>2 log inferieur) dans les LBA comparé aux crachats et aux aspirations bronchiques (Maurin, Hammer, et al. 2010). Pour la biopsie pulmonaire, la

sensibilité de la PCR apparait inférieure à celle de la culture (entre 17 à100%) en raison probablement de la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les tissus biopsiés.

La PCR sur prélèvements pulmonaires profonds présente une excellente spécificité (Hayden, et al. 2001, Ballard, et al. 2000, Herpers, et al. 2003). Toutes les études de PCR en temps réel rapportent une spécificité de 100% ; la spécificité varie de 93% à 100% pour la PCR classique.

Des tests de PCR multiplexe pour le diagnostic des pneumonies communautaires, détectant à la fois des virus et des bactéries dont *L. pneumophila* existent actuellement, comme le test RespiFinder ® SMART 22 (Pathofinder ®, Maastricht, The Netherlands).

PCR sur urines et sérum

La PCR sur ces prélèvements permet de contourner le problème des patients qui n'expectorent pas et évite la réalisation de prélèvements invasifs. Cependant les études sont limitées sur de tels prélèvements et la performance de la PCR dans ces conditions semblent nettement inférieure à celle des PCR réalisées sur prélèvements respiratoires.

La spécificité des PCR sur sérums semble très bonne proche de 100%, celle des PCR sur urines apparait un peu inférieure, entre 80 et 100%. En revanche, la sensibilité est relativement faible pour le sérum et varie de 29% à 100%. Cette faible sensibilité semble liée d'une part à une faible fréquence des bactériémies au cours de la légionellose, et d'autre part à la présence de très faibles quantités d'ADN dans le sang lorsqu'une bactériémie existe (Matsiota-Bernard, Waser et Vrioni 2000).

La PCR sur urines présente une sensibilité très variable selon les études, s'étendant de 7% à 86%. Une des explications possibles de cette faible sensibilité est l'excrétion intermittente d'ADN de *Legionella* dans les urines (Murdoch, Walford, et al. 1996, Matsiota-Bernard, Waser et Vrioni 2000).

Afin d'augmenter la sensibilité de ces tests de PCR, il semble important de multiplier les prélèvements de différentes origines et de répéter ces prélèvements sur plusieurs jours (Lindsay, et al. 2004).

4.2. Le diagnostic de la fièvre de Pontiac

Le diagnostic d'une épidémie de fièvre de Pontiac s'appuie habituellement sur l'isolement d'une souche de *Legionella* dans l'environnement par culture et par la positivité des sérologies *Legionella* (séroconversion ou multiplication par 4 au moins des titres anticorps anti-*Legionella*). La PCR a également été utilisée pour identifier *L. pneumophila* dans des échantillons environnementaux au cours d'une épidémie de fièvre de Pontiac (Miller, et al. 1993). En pratique, il est souvent difficile de recueillir des prélèvements respiratoires chez des patients présentant une pneumonie peu grave, et la culture de *Legionella* chez les patients atteints de fièvre de Pontiac est généralement négative (Jones, et al. 2003). Dans la littérature, un seul isolement de *L. pneumophila* a été décrit, chez un enfant et à partir d'un échantillon trachéal (Lüttichau, et al. 1998).

5. Traitement de la légionellose

5.1 Etude de la sensibilité de *L. pneumophila* aux antibiotiques

5.1.1 Les tests extracellulaires

Les *Legionella* sont des bactéries de croissance fastidieuse ce qui complique l'évaluation de leur sensibilité aux antibiotiques *in vitro*. Les valeurs de CMI dépendent du milieu de culture utilisé. Le milieu BCYE présente des inconvénients liés au charbon qui inactive certaines molécules d'antibiotiques comme les tétracyclines (Ruckdeschel et Dalhoff 1999). L'utilisation d'un milieu gélosé dépourvu de charbon tel que le BKYE (Buffer Ketoglutarate Yeast Extract) ou le BSYE (Buffered Starch Yeast Extract) donne des résultats plus fiables (Schulin et al 1998). Les CMIs peuvent également être déterminées en milieu liquide BYEα (Buffered Yeast Extract) ou BYEB (Buffered yeast extract broth) (Garcia et al 2000), avec

des CMIs très inférieures à celles obtenues en milieu BCYE. La méthode du E-test et les méthodes de dilution des antibiotiques en milieu gélosé ou liquide sont à privilégier.

L'inoculum bactérien varie entre différentes études de 10^3 à 10^7 UFC/ml, mais son augmentation d'un facteur 10^2 multiplie les CMIs d'un facteur 2 à 4 (Ruckdeschel et Dalhoff 1999, Pohlod, et al. 1981, Rhomberg et Jones 1994). L'incubation se fait à 35°C, en atmosphère enrichie ou non avec 5% de CO2, pendant 48 à 96 heures (Pendland, et al. 1997, Liebers, et al. 1989, Pohlod, et al. 1981). La technique optimale de détermination des CMIs pour les *Legionella* demeure toutefois à définir.

Une évaluation systématique des CMIs des souches isolées de *Legionella* n'est pas recommandée actuellement, du fait que les CMIs sont peu prédictives de l'activité des antibiotiques sur les formes intracellulaires des *Legionella*. D'autre part, aucune résistance acquise aux antibiotiques utilisés pour le traitement de la légionellose n'a été décrite en situation clinique à ce jour, malgré la fréquence des échecs thérapeutiques.

In vitro, en milieu extracellulaire, à l'exception de la vancomycine, des lincosamides, des sulfamides et de la colistine, la plupart des antibiotiques sont actifs vis-à-vis des *Legionella*. Des β- lactamases hydrolysant les pénicillines G et A, et la plupart des céphalosporines sont largement produites au sein des espèces du genre *Legionella* (à l'exception de *L. micdadei, L. feelii, L. maceachernii*). On observe alors une efficacité de l'utilisation des inhibiteurs de β-lactamases tel que l'acide clavulanique. L'imipenème est très actif in vitro.

La rifampicine possède les CMIs les plus basses et un ratio CMB/CMI entre 1 et 16 (Roch et Maurin 2005, Barker et Farell 1990), De nombreuses études ont montré que les macrolides sont efficaces *in vitro* vis-à-vis des *Legionella* (Dubois, St-Pierre et C 1999, Felmingham, et al. 1991) ; le ratio CMB/CMI pour les macrolides est entre 2 et 8 (Roch et Maurin 2005, Barker et Farell 1990). Les fluoroquinolones ont une excellente activité vis-à-vis des *Legionella* (Roch et Maurin 2005, Barker et Farell 1990).

Très récemment, une activité supérieure à celle de l'azithromycine a été démontrée pour la solithromycine *in vitro* (Mallegol et al. 2013).

5.1.2 Les tests intracellulaires :

Les méthodes extracellulaires conventionnelles de détermination des CMIs ne permettent pas de prédire la sensibilité aux antibiotiques des *Legionella* en situation intracellulaire. Ainsi, certaines bêtalactamines présentent des CMI basses *in vitro* mais sont inactives *in vivo* du fait de leur incapacité à pénétrer dans les cellules eucaryotes. L'utilité des modèles cellulaires est donc de prédire l'efficacité des antibiotiques vis-à-vis des *Legionella* au cours de leur multiplication intracellulaire. Ils permettent de définir une CMIE pour chaque antibiotique, c'est-à-dire une concentration minimale extracellulaire d'un antibiotique capable d'inhiber la croissance intracellulaire d'une souche de *Legionella*. Différents types cellulaires ont été utilisés : des macrophages alvéolaires prélevés chez différents animaux de laboratoire (Edelstein et Weiss 2003, Fitzgeorge, Featherstone et Baskerville 1988, Blatch, et al. 2005), des monocytes isolés du sang humain (Havlichek, Pohlod et Saravolatz 1987, Blatch, et al. 2005), des lignées cellulaires animales (lignéeJ774.1) (Higa, et al. 1998) ou humaines (lignée U-937, HL660, TPH61, MONO Mac 6, A-549 et MRC-5) (Jung 2002, Takemura, et al. 2000, Stout, Arnold et Yu 1998, Jonas, Engels, et al. 2001, Kunishima et al 2000, Ramirez, Summersgill, et al. 1993, Roch et Maurin 2005). Dans ces modèles, les fluoroquinolones et la rifampicine sont plus efficaces que l'érythromycine pour inhiber la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* (Blatch, et al. 2005, Stout, Arnold et Yu 1998, Stout, Sens, et al. 2005). La lévofloxacine et la moxifloxacine possèdent des ratios CMIE/CMI inférieurs à 1, ce qui correspond à une activité sur *L. pneumophila* intracellulaire pour des concentrations inferieures aux CMIs (Jonas, Engels, et al. 2001). Parmi les macrolides, l'azithromycine est plus active que l'érythromycine sur les *Legionella* intracellulaires (Stout, Arnold et Yu 1998, Segreti, Meyer et Kapell 1996). L'activité de la clarithromycine est également supérieure à celle de l'érythromycine dans les modèles cellulaires (Jung 2002, Blatch, et al. 2005). Plus

récemment, une nouvelle classe de macrolides, les kétolides (par exemple la télithromycine), ont montré une excellente activité vis-à-vis des *Legionella* dans la lignée cellulaire HL-60 (Stout, Arnold et Yu 1998) et en monocytes humains (Baltch et al 2000).

Julia Mallegol et al. (Mallegol et al. 2013).ont montré que la solithromycine possède une activité supérieure à l'azithromycine i*n vitro* en milieu cellulaire et en modèle cellulaire, vis-à-vis de toutes les souches de *L. pneumophila* sg1. Le développement clinique de ce nouveau fluoroketolide est déjà en phase 3. Cette molécule constitue une alternative prometteuse pour le traitement de la légionellose.

En 2013, Harrison et al. (Harrison et al. 2013) ont presenté une nouvelle méhode d'évaluation de la sensibilité de *L. pneumophila* basée sur la culture de cette bactérie dans l'amibe *A. castellanii*. Ce test a permis de montrer une propriété antibactérienne inattendu de l'inhibiteur de l'APT1 palmostatine M. L'activité antibactérienne de la palmostatine M semble être spécifique aux bactéries des genres *Legionella* et *Mycobacterium*.

5.1.3 Modèle animal

L'efficacité in vivo des antibiotiques a été étudiée expérimentalement chez le cobaye infecté par inhalation d'aérosols ou par inoculation directe de *Legionella* par voie intra-trachéale (Edelstein, Calarco et Yasui 1984, Edelstein, Shinzato, et al. 2001). Ces tests ont montré que les bêta-lactamines et les aminosides sont inactifs *in vivo* sur *L.pneumophila* (Edelstein, Calarco et Yasui 1984). L'azithromycine est le plus efficace parmis les macrolides (Edelstein, Review of azithromycin activity against Legionella spp 1995). La rifampicine est moins efficace que les fluoroquinolones (Edelstein, Calarco et Yasui 1984, Nowicki, et al. 1988, Jarraud et Freney 2012). Plusieurs études ont montré que les fluoroquinolones sont plus efficaces que les macrolides (Saito, et al. 1985, Nowicki, et al. 1988). La lévofloxacine réduit la concentration bactérienne pulmonaire dés le premiér jour d'antibiotherapie (Kashimoto, et al. 2009).

5.2 Le traitement antibiotique

5.2.1 Les antibiotiques utilisés pour le traitement de la légionellose :

Les antibiotiques utilisés en première ligne dans le traitement de la légionellose sont les macrolides et les fluoroquinolones. La rifampicine est parfois utilisée en association avec un autre antibiotique actif, mais expose à une toxicité hépatique.

5.2.1.1 Les macrolides

L'utilisation de l'érythromycine sous forme orale ou intraveineuse est classique. En effet, l'efficacité de l'érythromycine a été démontrée au cours de l'épidémie de Philadelphie en 1976 (Edlestein, Meyer et Finegold 1980). La formulation injectable nécessite de surveiller les effets secondaires tels qu'une intolérance digestive, des troubles du rythme cardiaque et une veinotoxicité. La clarithromycine, la roxithromycine et la josamycine sont plus efficaces in vitro sur *Legionella* que l'érythromycine. La roxithromycine et la josamycine ne peuvent être administrées que par voie orale. La clarithromycine existe aussi en formulation intraveineuse pour laquelle l'AMM en France ne comporte pas d'indication en lien avec la légionellose. La spiramycine semble moins active in vitro que l'érythromycine, mais son efficacité clinique semble similaire. Cet antibiotique prèsente un niveau très faible d'interactions médicamenteuses et les deux formulations orale et intraveineuse sont disponibles. Bien que l'azithromycine soit le macrolide le plus efficace sur *Legionella* in vitro et en modèles animaux (Edelstein 1995), cette molécule n'a pas d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour la légionellose en France.

5.2.1.2 Les fluoroquinolones

Parmi les fluoroquinolones, la lévofloxacine est actuellement la molécule la plus utilisée dans le traitement de la légionellose. Toutes les fluoroquinolones disposent d'une AMM pour leur administration par voies intraveineuse et orale, et ont une excellente biodisponibilité ce qui rend leur utilisation très flexible chez les patients hospitalisés (Cunha 2006). Ils sont

également caractérisés par une excellente pénétration dans la plupart des tissus et fluides corporels, bien que leurs taux sériques sont généralement faibles (Phillips et King 1988). Cependant, du fait de leur spectre large, leur utilisation doit être limitée pour éviter l'émergence d'antibiorésistances (on peut citer l'exemple de la résistance aux fluoroquinolones des entérobactéries et son impact sur la diffusion des bêta-lactamases à spectre étendu de type CTX-M).

La voie d'administration parentérale est utilisée dans les cas graves de légionellose et/ou lorsqu'existent des troubles digestifs même mineurs. Les doses d'antibiotiques doivent être adaptées au terrain du patient (insuffisance hépatique, rénale, etc.). La durée du traitement est de 8 à 14 jours pour les formes de gravité faible à modérée (5 jours pour l'azithromycine), mais de 21 jours pour les formes graves et/ou chez le patient immunodéprimé (10 jours pour l'azithromycine). Récemment, une étude a montré que l'utilisation d'une fluoroquinolone, la bazufloxacine, combinée à l'érythromycine, à un corticoïde (la méthylprednisolone) et au sivelestat (un inhibiteur de l'élastase des neutrophiles), était très efficace dans les cas graves de légionellose (Kakeya, et al. 2008).

5.2.1.3 Rifampicine

La rifampicine est très efficace vis-à-vis des *Legionella in vitro* et *in vivo* (Baltch et al 2000), et peut être associée à l'érythromycine dans les formes graves de légionellose et/ou chez les patients à risque (Edelstein 1998). Elle ne doit pas être utilisée en monothérapie afin d'éviter la sélection de mutants résistants (Nielsen, Bangsborg et Hoiby 2000). Une étude a rapporté que la combinaison de la rifampicine et de la clarithromycine n'apporte pas de bénéfice supplémentaire par rapport à la clarithromycine en monothérapie, mais au contraire pourrait prolonger la durée de séjour en raison de possibles interactions médicamenteuses négatives. Ceci pourrait également concerner d'autres antibiotiques (Grau et al 2006).

5.2.2 Recommandations thérapeutiques

5.2.2.1 Stratégie thérapeutique (en cas de légionellose confirmée)

Plusieurs facteurs influencent le choix thérapeutique tel que l'efficacité clinique démontrée, la gravité de la légionellose, le terrain sous-jacent (troubles hépatiques, digestifs, interactions médicamenteuses), et la sécurité d'emploi de l'antibiotique.

Les macrolides sont recommandés en monothérapie pour le traitement des cas modérés de légionellose (formes ambulatoires, formes hospitalisées dans un service de médecine), et en association pour les formes graves (hospitalisation en unité de soins intensifs ou en réanimation) et/ou chez les sujets à haut risque.

Aucune étude clinique n'a montré clairement la supériorité des fluoroquinolones par rapport aux macrolides (Sabria et Yu 2002, Pedro-Botet et Yu 2006, Calbo et Garau 2006, Haranaga, et al. 2007, Falcó V1, et al. 2006). Cependant, le temps nécessaire pour obtenir une apyrexie et la durée moyenne d'hospitalisation sont en règle générale plus courts lorsqu'une fluoroquinolone est utilisée (Pedro-Botet et Yu 2006, Calbo et Garau 2006, Haranaga, et al. 2007).

L'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) recommande d'adapter le choix de l'antibiotique en fonction de la gravité de la maladie et du terrain du patient. La durée du traitement est de 10 jours pour les formes peu graves ou de 14 à 21 jours minimum chez les patients immunodéprimés et au cours des formes graves (Roige et Rello 2003, Sandkovsky, et al. 2008).

5.2.2.2 Association d'antibiotiques

La bithérapie est conservée pour traiter les formes graves de légionellose (hospitalisées en service de soins intensifs ou de réanimation) et/ou des sujets immunodéprimés, mais sans preuve de supériorité par rapport à une monothérapie.

(i) Associations comportant la rifampicine: plusieurs observations ont montré une moindre efficacité lorsque la rifampicine est associée à la Clarithromycine. Les associations

comportant la rifampicine ne sont donc pas recommandées du fait des risques d'interactions médicamenteuses chez les patients greffés et les patients polymédicamentés.

(ii) Associations fluoroquinolones et macrolides : l'administration de lévofloxacine, ofloxacine ou ciprofloxacine par voie intraveineuse nécessite des précautions importantes (ECG et kaliémie souhaitables avant administration) chez les patients recevant d'autres médicaments susceptibles d'allonger l'intervalle QTc dont les macrolides. L'association moxifloxacine et macrolide par voie IV est contre-indiquée.

6. Les fluoroquinolones :

6.1 Historique et structure :

Les quinolones sont des dérivés de la quinoléine, molécule préparée par synthèse chimiqueen 1962 (Lesher, et al. 1962). L'acide nalidixique a été un des premiers dérivés actifs. Les fluoroquinolones ont été développées durant les années 1970 par l'ajout d'un atome de fluor favorisant la biodisponibilité et la pénétration intracellulaire de ces molécules. Les fluoroquinolones sont actives sur de nombreux pathogènes : des bacilles Gram négatif, notamment des genres *Salmonella, Escherichia, Shigella, Neisseria, Proteus, Enterobacter, Helicobacter* ; et des bacilles à Gram positif, notamment les genres *Staphylococcus* et *Streptococcus*.

La péfloxacine, la ciprofloxacine, l'ofloxacine, la lévofloxacine, la norfloxacine, l'énoxacine, la loméfloxacine, la moxifloxacine et la sparfloxacine sont des fluoroquinolones. Ces molécules possèdent toutes un atome de fluor (Van Bambeke F 2005).

6.2 Mécanismes d'action des fluoroquinolones:

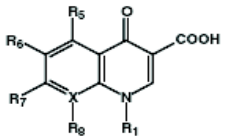
Les fluoroquinolones ciblent généralement deux enzymes de la classe des topoisomérases : l'ADN gyrase, cible principale chez les bactéries à Gram négatif ; et la topoisomérase IV, cible principale chez les bactéries à Gram positif. La cible principale peut également varier en fonction des molécules : la sparfloxacine, la grepafloxacine, la gemifloxacine et la

nadifloxacine ont pour cible principale l'ADN gyrase chez les bactéries à Gram positif (Pan, Yague et Fisher 2001, Heaton, Ambler et Fisher 2000). Concernant les nouvelles fluoroquinolones, comme la moxifloxacine, la besifloxacine et la clinafloxacine, l'affinité est égale pour les deux topoisomérases (Morris JE 2002, Cambau, Matrat, et al. 2009).

Les topoisomérases sont responsables du surenroulement de la molécule d'ADN (ADN Gyrase), nécessaire au stockage de cette molécule sous forme compacte ou, inversement, au déroulement local de l'ADN lors de la réplication ou de la traduction en ARNm de celui-ci (topoisomérase IV). Les topoisomérases modifient donc la topologie de l'ADN. L'ADN gyrase est un tétramère constitué de deux sous-unités A et deux sous-unités B, codées respectivement par les gènes *gyrA* et *gyrB* ((Drlica et Zhao 1997). L'ADN gyrase bactérienne catalyse la formation de super-tours négatifs dans l'ADN bactérien. Cette activité est centrée sur le résidu tyrosine en position 122 de la sous-unité A. La sous-unité B comprend un motif d'hydrolyse de l'ATP fournissant l'énergie nécessaire à l'activité enzymatique. Ainsi, l'ADN gyrase compense les super-tours positifs résultant de l'action de l'ADN polymérase au cours du processus de réplication de l'ADN. Pour exercer son activité, l'ADN gyrase introduit des coupures doubles brin en amont de la fourche de réplication, puis des re-ligatures des liaisons phosphodiesters dans le squelette d'ADN (Hawkey 2003).

La topoisomérase IV présente des analogies structurales avec l'ADN gyrase. Elle est composée de deux sous-unités C et deux sous-unités E codées respectivement par les gènes *parC* et *parE*. Le mécanisme d'action (coupure-religature) de la topoisomérase IV est similaire à celui de l'ADN gyrase mais, contrairement à celle-ci, elle se lie en aval de la fourche de réplication et conduit à un relâchement de la double hélice d'ADN. Cette enzyme intervient surtout dans la décaténation des copies répliquées du chromosome ou des plasmides. Chacune de ces enzymes est formée de 4 sous unités organisées en 2 paires identiques responsables respectivement de la liaison de l'ADN (GyrB/ParE) et de l'action catalytique (GyrA/ParC).

Les fluoroquinolones inhibent de manière sélective la synthèse de l'ADN en s'intercalant dans la poche ménagée lors de l'ouverture locale des brins d'ADN. Les quinolones induisent un changement conformationnel des topoisomérases. Ces enzymes induisent une coupure sur l'ADN et la quinolone empêche sa re-ligature. Elles agissent en se liant au complexe formé entre l'ADN et les topoisomérases de type II (Hawkey 2003, Drlica et Zhao 1997). Le complexe formé avec l'ADN gyrase inhibe rapidement la réplication de l'ADN, car il se forme en amont de la fourche de réplication. L'inhibition de la réplication par le complexe contenant la topoisomérase IV se produit plus lentement car il se situe derrière cette fourche (Khodursky, Zechiedrich et Cozzarelli 1995). La formation de ces complexes inhibe la réplication de l'ADN et la croissance cellulaire de manière réversible, ce qui rend compte de l'action bactériostatique des quinolones. L'action bactéricide des fluoroquinolones, irréversible, serait liée à la présence des extrémités libres d'ADN persistant après dissociation du complexe. L'action bactéricide requiert des concentrations de quinolones plus élevées que celles nécessaires à la formation des complexes et à l'inhibition de la croissance. A noter que certaines quinolones inhibent mieux la croissance bactérienne mais sont moins bactéricide que d'autres molécules moins inhibitrices (Zhao X 1997).



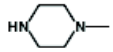
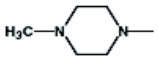
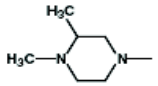
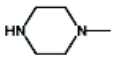
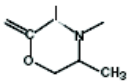
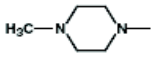
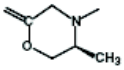
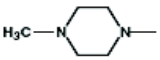
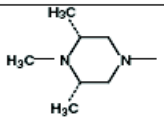
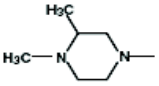
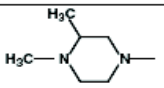
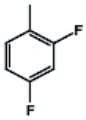
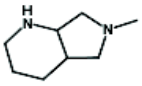
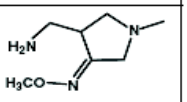
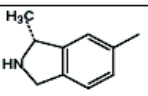
generation	drug [orig. ref./patent]]	X	R_8	R_1	R_5	R_6	R_7
1	nalidixic acid [283;284]	N		$-CH_2-CH_3$	H	H	$-CH_3$
2a	**norfloxacin** [285-287	C	H	$-CH_2-CH_3$	H	F	
	pefloxacin [288;289]	C	H	$-CH_2-CH_3$	H	F	
	lomefloxacin [290;291]	C	F	$-CH_2-CH_3$	H	F	
	ciprofloxacin [292-294]	C	H		H	F	
	ofloxacin [295;296]				H	F	
	levofloxacin [297;298]				H	F	
2b	*sparfloxacin* [299;300]	C	F		$-NH_2$	F	
	grepafloxacin [301;302]	C	H		$-CH_3$	F	
3a	gatifloxacin [303;304]	C	$-O-CH_3$		H	F	
	trovafloxacin [305;306]	N			H	F	
	moxifloxacin [307;308]	C	$-O-CH_3$		H	F	
3b	gemifloxacin [309;310]	N			H	F	
4	garenoxacin [311;312]	C	$-O-CHF_2$		H	H	

Figure 20: Pharmacophores et structures des principales quinolones qui ont été approuvés pour l'utilisation humaine (Van Bambeke et al 2005)

6.3 Mécanismes de résistance bactérienne aux fluoroquinolones

L'émergence de résistances bactériennes aux fluoroquinolones a été rapportée au cours de la décennie qui a suivie l'introduction de ces antibiotiques en thérapeutique.

Les mécanismes connus de résistance sont : i) l'altération de la cible, ii) la diminution de l'accumulation des quinolones à l'intérieur de la bactérie, due à l'imperméabilité de la membrane et /ou à une surexpression d'une pompe à efflux et iii) la protection des cibles des fluoroquinolones grâce à l'expression de gènes plasmidiques. (Tran, Jacoby et Hooper 2005).

6.3.1 Altération de la cible :

C'est le principal mécanisme de résistance due à l'acquisition de mutations localisées dans les gènes codant l'ADN gyrase chez les bactéries à Gram négatif (Lee, et al. 2005) ou la topoisomérase IV chez les bactéries à Gram positif (Khodursky, Zechiedrich et Cozzarelli 1995).

6.3.1.1 Altération de l'ADN gyrase:

L'ADN gyrase est un tétramère constitué de 2 sous-unités GyrA (codées par *gyrA*) et deux sous-unités GyrB (codées par *gyrB*). La région nommée QRDR (pour Quinolone Resistance Determining Region) du gène *gyrA*, qui code pour 41 acides aminés au niveau de la région N-terminale de la protéine GyrA, est considérée comme la cible majeure des altérations responsables des résistances aux fluoroquinolones. Cette région correspond aux codons 67 à 106 chez *E. coli* (Yoshida, et al. 1991). Il s'agit des acides aminés proches du site actif de l'ADN gyrase, au niveau du résidu tyrosine Tyr122 qui interagit avec l'extrémité 5' de l'ADN au site de coupure.

Les substitutions au niveau de cette région peuvent affecter l'affinité de la liaison entre les quinolones et le site actif de GyrA, entrainant une résistance à ces antibiotiques (Willmott et

Maxwell 1993). Les études concernant les mutations dans *gyrA* ont été consacrées principalement aux entérobactéries, en particulier à *Escherichia coli* (Ruiz 2003).

Les plus fréquentes substitutions d'acides aminés observées chez les mutants sélectionnés en laboratoire et chez les souches cliniques concernent les codons Ser83 et Asp87 (en prenant le gène *gyrA* d'*E. coli* comme référence) (Vila et al 1994), Chez *E. coli,* ces mutations sont responsables d'un haut niveau de résistance par rapport à d'autres mutations dans la région QRDR (Yoshida et al 1990). Au niveau du codon 83, la substitution Ser83Leu cause un niveau de résistance supérieur à la substitution Ser83Ala (Tavío, et al. 1999). Les substitutions Asp87Tyr et Asp87Gly sont associées à des CMIs à la ciprofloxacine inférieures à celle conférée par Asp87Asn (Sáenz, et al. 2003). Des substitutions d'acides aminés à d'autres positions dans la région QRDR telles que Ala67, Gly81, Asp82, Ala84 et Gln106 ont été détectées chez *E. coli* à des fréquences beaucoup plus basses et plusieurs d'entre elles ont été détectées seulement in vivo (positions Ala67, Asp82 et Gln106) (Vila et al 1994, Yoshida et al 1990, Truong, et al. 1997 , Tambau et al 1993, Hallett et Maxwell 1991). Les substitutions Gly81Asp, Asp82Gly, Asp87Asn, Asp87Gly et Asp87Tyr sont responsables d'un bas niveau de résistance lorsqu'elles ont lieu de façon isolée (Chen, Zheng et Lu 2006, McDonald et al 2001). D'après plusieurs études, la combinaison de deux substitutions aux codons 83 et 87 permet une augmentation significative du niveau de résistance (Everett, et al. 1996, Vila et al 1994). Au contraire, une étude a rapporté que deux mutations dans *gyrA* augmentaient les CMIs aux fluoroquinolones à des valeurs approximativement similaires à celles résultant d'une seule mutation (Morgan-Linnell et Zechiedrich 2007). Les substitutions Gly81Asp (Cambau, Matrat, et al. 2009, Moniot-Ville et al 1991), et Gln106Arg (Hallett et Maxwell 1991) confèrent une plus grande résistance aux fluoroquinolones qu'à l'acide nalidixique. Toutefois, la présence concomitante de Gly81Asp et Asp82Gly confère une résistance à la fois à l'acide nalidixique et aux fluoroquinolones (Truong, et al. 1997). Plusieurs substitutions liées à la résistance aux fluoroquinolones ont été détectées en dehors

de la région QRDR chez *E. coli*, telle qu'Ala196Glu (Komp Lindgren, Karlsson et Hughes 2003), et Ala51Val (Friedman, Lu et Drlica 2001). Ces études ont recommandé d'élargir la région QRDR (Capoor et al 2009, Hopkins, Davies et Threlfall 2005).

Almahmoud et al. (Almahmoud, et al. 2009), ont étudié les mécanismes génétiques de résistance aux fluoroquinolones chez *L. pneumophila.* Cette étude a montré que la mutation affectant le codon *gyrA83* (T83I) survient précocement au cours du processus de sélection de la résistance, et est responsable d'une résistance de haut niveau. Les mutations *gyrA87* (D87N) ou (D87H) et *gyrA81* sont impliquées dans la résistance à ces antibiotiques.

Les mutations dans la région QRDR du gène *gyrB* ont été détectées chez plusieurs espèces bactériennes. Chez *E. coli*, des substitutions entraînant une résistance aux quinolones ont été décrites pour les codons 426 (Asp426Asn) et 447 (Lys447Glu) (Yoshida et al 1990). Une substitution en position 426 semble conférer la résistance à toutes les quinolones, tandis que celle en position 447 entraîne un haut niveau de résistance à l'acide nalidixique seulement. Des mutations dans les mêmes positions ont été décrites chez les bactéries à Gram positif (Cambau, Matrat, et al. 2009, Ito et al 1994). Une publication récente a rapporté deux substitutions pour les codons 456 et 471 chez des isolats cliniques d'*E. coli* (Morgan-Linnell et al 2009). Chez *Salmonella typhimurium*, des substitutions en positions Ser463 et Ser464 ont également été rapportées (Heisig, et al. 1995, Casin, et al. 2003).

In vitro, la fréquence des mutations spontanées dans *gyrA* chez *E. coli* est similaire à celles de *gyrB* (Nakamura et al 1989). Chez d'autres bactéries à Gram négatif telles que *Proteus mirabilis* la mutation dans *gyrB* est la plus fréquente (Weigel, Anderson et Tenover 2002).

Tableau 3 : Mutations décrites dans les sous unités GyrA et GyrB chez les souches d'*E. coli* résistantes aux fluoroquinolones (Hopkins, Davies et Threlfall 2005)

Gène	Codon affecté	Acide aminé dans la souche sauvage	Substitution
gyrA	44	Leu	Ile
	67	Ala	Ser
	76	Asp	Asn
	81	Gly	Cys, Asp
	82	Asp	Gly
	83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
	84	Ala	Pro, Val
	87	Asp	Asn, Gly, Tyr, His, Val
	106	Gln	Arg, His
	196	Ala	Glu
gyrB	426	Asp	Asn
	447	Lys	Glu
parC	56	Ala	Thr
	57	Ser	Thr
	78	Gly	Asp, Lys
	80	Ser	Arg, Ile
	83	Ser	Leu
	84	Glu	Gly, Lys, Val
	108	Ala	Val
parE	416	Leu	Phe
	444	Ile	Phe
	445	Leu	His
	458	Ser	Thr
	460	Glu	Asp
	464	Ile	Phe
	529	Ile	Leu

6.3.1.2 Altération de la topoisomérase IV :

La topoisomérase IV est un tétramère constitué de deux sous-unités ParC (codées par *parC*) et ParE (codées par *parE*). Chez les bactéries à Gram positif, les mutations de résistance aux fluoroquinolones concernent en priorité le gène *parC*. Chez *Streptococcus pneumonie*, la majorité des substitutions affecte les positions 80 et 84 de *parC* (numérotation selon *E. coli*) (Otani, et al. 2003, Pérez-Trallero, et al. 2003, De Vecchi, et al. 2009), et de manière moins fréquente les positions 81 et 92 (Malhotra-Kumar, Van Heirstraeten et Lamme 2009, de la Campa, et al. 2009). Chez *Staphylococcus aureus*, les substitutions principales se trouvent également dans les codons 80 et 84 de *ParC* (Cambau, Matrat, et al. 2009, Bhagwat et al 2009, Ince et Hooper 2001, Noguchi et al 2005), mais un grand nombre ont été décrites à d'autres positions, telles que Ala116Pro, Arg17His, Lys23Asn, Glu87Lys, Asp69Tyr, Ala116Glu, 176 Ala176Gly ou Pro451Gln (Li et al 2004, Ince et Hooper 2001).

Chez les bactéries Gram négatif, en particulier chez *E. coli*, la sous-unité *gyrA* de l'ADN gyrase est considérée comme la cible principale. Ainsi, la mutation dans le gène *parC* (cible

secondaire) n'entraine aucun changement important de phénotype de résistance en cas d'absence de mutation dans la cible principale (Briñas, et al. 2003, Komp Lindgren, Karlsson et Hughes 2003, Fendukly et al 2003). Les mutations dans *parC* ne sont détectables que parmi les mutants *gyrA* déjà résistants à des concentrations élevées de fluoroquinolones (Khodursky, Zechiedrich et Cozzarelli 1995). La plupart des substitutions détectées dans *parC* conduisant à une résistance se trouvent dans les codons 80 et 84 (Cambau, Matrat, et al. 2009, Ruiz 2003, Hopkins, Davies et Threlfall 2005, Pan et Fisher 1997) et plus rarement au niveau du codon 78 (Kumagai, et al. 1996, Heisig 1996). Cette dernière mutation entraîne une augmentation de la résistance aux fluoroquinolones mais pas à l'acide nalidixique (Cambau, Bordon, et al. 1993). Une substitution a été décrite chez des mutants de laboratoire de *Shigella flexneri* en position 79 (Chu, Houang et Cheng 1998). Des substitutions en dehors de la région QRDR de ParC ont également été identifiées aux codons Ala56Thr et Ser57Thr chez *E. coli et klebsiella pneumonie* (Fendukly et al 2003), et aux codons Thr57Ser et Thr66Ile chez *Salmonella enterica* (Eaves et al 2004, Lindstedt, Aas et Kapperud 2004).

Les mutations rapportées dans le gène *parE* chez plusieurs bactéries à Gram négatif ou positif semblent associées à des mutations dans *gyrA* et *parC* (Giraud, Baucheron et Cloeckaert 2006). Il a été proposé que les substitutions dans *parE* n'augmentent pas la résistance aux fluoroquinolones (Ruiz 2003), sauf si elles sont associées à d'autres mutations affectant les gènes codant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Morgan-Linnell et al 2009). Chez *E. coli*, plusieurs substitutions dans *parE* ont été décrites (Komp Lindgren, Karlsson et Hughes 2003, Morgan-Linnell et Zechiedrich 2007, Fendukly et al 2003). Elles sont toutes différentes de celles décrites chez d'autres espèces à Gram négatif telles que *Salmonella* (substitutions aux positions 453, 461, 498, 512, 518) (Eaves et al 2004, Ling et al 2003), *Haemophilus influenzae* (substitutions aux positions 474 et 542) (Li et al 2004), et *Neisseria gonorrhoeae* (substitution à la position 439) (Lindback 2002).

6.3.2 Diminution de l'accumulation des quinolones :

Un autre mécanisme de résistance aux fluoroquinolones correspond à une imperméabilité de la paroi bactérienne vis-à-vis de ces agents antibactériens et/ou la surexpression de pompes d'efflux.

6.3.2.1 L'imperméabilité de la paroi

L'imperméabilité de la paroi bactérienne peut être naturelle, ou acquise par diminution du nombre de porines due à la réduction de l'expression des gènes codant les protéines qui forment les canaux permettant normalement aux molécules de pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne au travers de la membrane externe.

Chez *E. coli*, la membrane externe possède trois porines principales (OmpA, OmpC et OmpF). Une diminution du niveau d'expression de OmpF est liée à la résistance à acide nalidixique (Aoyama et al 1987, Hirai et al 1986), mais n'affecte pas les CMIs aux autres quinolones, comme la tosufloxacine ou la sparfloxacine (Mitsuyama et al 1992). De plus, une diminution de l'expression d'OmpF conduit à une diminution de la sensibilité aux autres agents antibactériens tels que les β-lactamines, les tétracyclines et le chloramphénicol (Hawkey 2003).

6.3.2.2 La surexpression d'une pompe à efflux

La surexpression d'une pompe à efflux à force protonmotrice peut causer une réduction de la concentration des fluoroquinolones à l'intérieur de la cellule bactérienne. Ce mécanisme est souvent associé à des mutations dans les gènes cibles, en particulier chez les mutants présentant un haut niveau de résistance. Il existe cinq familles différentes de pompes à efflux : ABC (ATP Binding Cassette), RND (Resistance Nodulation Division), MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Staphylococcal Multi Resistance) et MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion) (Piddock 2006).

La famille SMR est la plus impliquée dans l'efflux des fluoroquinolones chez *S. aureus*, ce qui se traduit par une expression accrue de *norA*, un gène qui code un transporteur à large spectre (Yoshida, et al. 1991). Cette famille contribue à la résistance vis-à-vis des fluoroquinolones chez *S. pneumonie* (Brenwald et al 2003), d'autres bactéries Gram positif et chez les *mycobactéries* (G. Jacoby 2005).

La famille RND est la plus impliquée dans l'efflux des fluoroquinolones chez les bactéries à Gram négatif. Chez *E. coli*, la pompe à efflux AcrAB-TolC joue un rôle majeur dans l'efflux des quinolones (Alekshun et Levy 1997). Les autres bactéries entériques semblent être équipées de façon similaire (Cohen et Levy 1993). La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* possède au moins quatre pompes à efflux capables d'exporter les quinolones et d'autres agents antimicrobiens : MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN (Piddock 2006, Poole et Srikumar 2001). Des pompes à efflux ont également été trouvées chez *Stenotrophomonas maltophilia* et *Acinetobacter baumannii* (Magnet, Courvalin et Lambert 2001, Alonso et Martinez 2001). L'absence de spécificité de ces pompes à efflux signifie qu'elles peuvent être activées en réponse à d'autres composés (autres familles d'antibiotiques, antiseptiques, détergents, ou encore le salicylate de sodium) (Alekshun et Levy 1999).

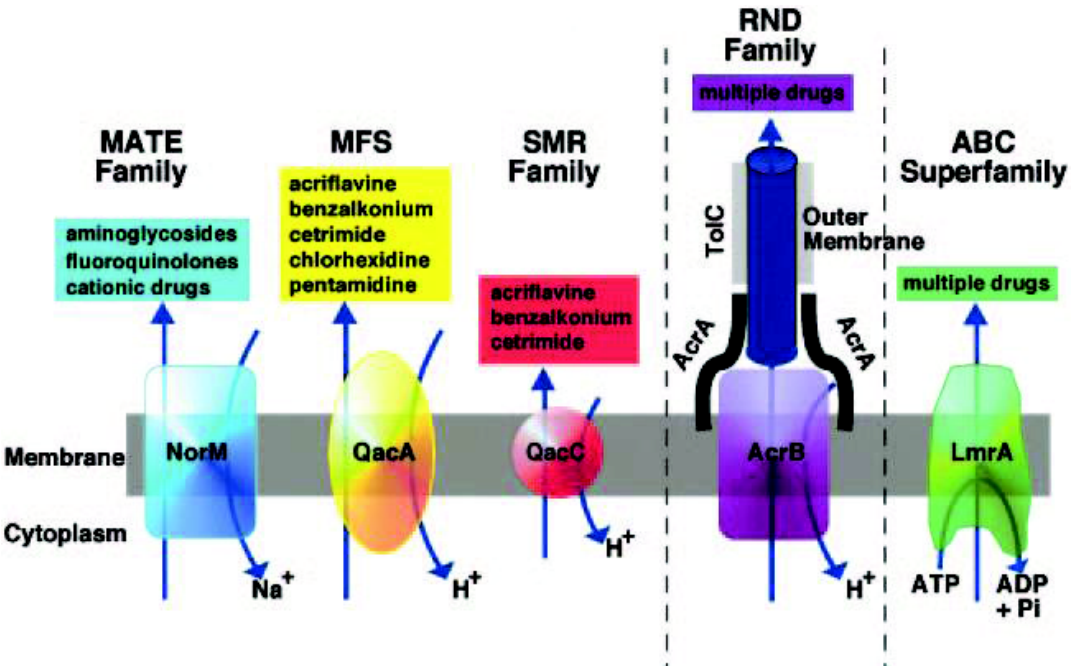


Figure 21 : Comparaison schématique des cinq familles de pompes à efflux (Piddock 2006)

6.3.3 La résistance plasmidique:

L'émergence et la diffusion d'une résistance plasmidique aux quinolones ont été rapportées depuis 1998, en particulier chez les entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre étendu (BLSE) (Rodríguez-Martínez, et al. 2011). Trois gènes acquis situés sur des plasmides impliqués dans les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones ont été nouvellement décrits.

Le premier mécanisme plasmidique de résistance aux fluoroquinolones (PMQR) nommé Qnr (quinolone résistance) a été décrit en 1990 chez *Klebsiella pneumoniae* (Martínez-Martínez L 1998). Les protéines de type Qnr (QnrA, QnrB, QnrS et plus récemment QnrC et QnrD) appartiennent à une famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés (Tran, Jacoby et Hooper 2005, Crémet, et al. 2011). Ces protéines se fixent directement à l'ADN gyrase et à la topoisomérase IV ce qui entraine une diminution de l'affinité de ces enzymes pour l'ADN et de ce fait les protège de l'action des quinolones par un mécanisme inconnu (Jacoby, et al. 2008) (Tran, Jacoby et Hooper 2005), Généralement les gènes *qnr* sont détectés souvent dans des isolats communautaires d'entérobactéries (Robicsek, Jacoby et Hooper 2006).

Un second mécanisme PMQR est dû à l'émergence du gène muté AAC (6')-Ib-cr (pour ciprofloxacin resistance). À l'origine, le gène AAC (6')-Ib code pour une aminoglycoside acétyl-transférase responsable d'une résistance à la tobramycine, à l'amikacine et à la kanamycine, antibiotiques de la famille des aminoglycosides. Après deux mutations, cette enzyme est devenue capable d'acétyler la norfloxacine, la ciprofloxacine (et probablement l'enrofloxacine). Les autres fluoroquinolones possédant des structures chimiques différentes restent insensibles à cette enzyme (Robicsek, Strahilevitz, et al. 2006 , Périchon, Courvalin et Galimand 2007). Les isolats bactériens possédant cette enzyme sont très répandus.

(Robicsek, Jacoby et Hooper 2006).

Le troisième mécanisme a été découvert récemment: il s'agit d'une protéine agissant comme une pompe à efflux (QepA pour quinolone efflux pump) décrite dans un premier temps chez

des souches d'*E. Coli.* Le gène *qepA* augmente la résistance vis-à-vis des fluoroquinolones hydrophiles, dont la norfloxacine, la ciprofloxacine et l'enrofloxacine, sans affecter les autres classes d'antibiotiques (Périchon, Courvalin et Galimand 2007, Yamane, et al. 2005).

Ces nouveaux mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones augmentent considérablement les transferts horizontaux de gènes responsables de résistance vis-à-vis des fluoroquinolones (Robicsek, Strahilevitz, et al. 2006 , Cattoir et Nordmann 2009).

6.4 Résistance chez les bactéries intracellulaires :

A ce jour, les données de la littérature concernant la résistance aux fluoroquinolones chez les bactéries intracellulaires comme *Rickettsia, Chlamydia trachomatis, C. burnetii, L. pneumophila, Bartonella bacilliformis* ou *Brucella melitensis* sont rares. Pourtant, le spectre d'action des fluoroquinolones comporte les maladies causées par ces pathogènes. On considère actuellement que ces bactéries peuvent difficilement développer des résistances aux fluoroquinolones en situation clinique, puisqu'aucun mutant n'a été isolé dans des prélèvements humains, animaux ou environnementaux pour certains d'entre eux. Toutefois, de nombreux cas d'échecs thérapeutiques après administration d'une fluoroquinolone ont été décrits au cours des infections liées à ces pathogènes (Laferl et al 2002, Kurz et al 1988).

L'étude des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones liées aux topoisomérases de type II chez *C. trachomatis* a montré que la majorité des substitutions dans GyrA et ParC ne sont pas situées dans les codons critiques pour la résistance aux fluoroquinolones. Ces substitutions sont Met52Tre, Gly60Ala, Val61Ala, Lys62Arg, Cys66Arg et His78Arg dans GyrA, et His52Thr, Asn56Ser, Ile72Asn et Arg83Gly dans ParC (Yokoi et al 2004). Chez des mutants de *C. burnetii* sélectionnés in vitro, une substitution dans GyrA au codon Glu87Gly a été décrite (Musso et al 1996). Enfin, chez *Brucella*, deux études ont identifié des mutants résistants aux fluoroquinolones in vitro et des substitutions dans *gyrA* ont été obtenues aux

codons Ala83Val, Asp87Tyr et Asp87Asn (Turkmani, et al. 2008, Ravanel, Gestin et Maurin 2009).

7. Objectif de mon travail de thèse

Un objectif principal concernant la légionellose est de pouvoir prédire plus efficacement une évolution clinique défavorable de la maladie chez les patients infectés par *L. pneumophila*, et d'améliorer ainsi la prise en charge et le pronostic de ces patients à risque d'évolution fatale. Il s'agit notamment de mieux caractériser les causes des échecs thérapeutiques observés chez les patients infectés malgré l'administration d'un traitement antibiotique correspondant aux recommandations actuelles. Il s'agit d'autre part de développer des tests microbiologiques objectifs prédictifs d'une évolution clinique défavorable, qu'elle qu'en soit la cause.
L'objectif de mon travail de thèse consistait à répondre à ces deux exigences. D'une part je me suis intéressée à la possibilité d'acquisition de résistance aux antibiotiques chez des souches environnementales ou cliniques de *L. pneumophila*. D'autre part, j'ai tenté d'élaborer et de valider des tests moléculaires permettant d'évaluer à la fois l'efficacité du traitement antibiotique et le pronostic final des patients. Ce travail de recherche a été effectué en continuité des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire, en collaboration avec le Centre National de Référence des *Legionella* (Maurin, Hammer, et al. 2010, Joly, et al. 2006, Almahmoud et al, 2009).

TRAVAUX PERSONNELS

Travail personnel n°1

INTRODUCTION

La Légionellose est une pneumonie aiguë potentiellement fatale causée par l'inhalation d'aérosols contenant des bactéries du genre *Legionella*. Les *Legionella* sont des bactéries à Gram négatif, intracellulaire facultatives. L'espèce *L. pneumophila* est responsable à elle seule d'environ 90% des cas de légionellose dans le monde. La gravité de la légionellose dépend principalement du terrain du patient et du délai d'administration d'une antibiothérapie appropriée. Les macrolides et les fluoroquinolones représentent actuellement le traitement de première intention de la légionellose. À ce jour, aucune résistance acquise à ces antibiotiques n'a été décrite. Cependant, les échecs thérapeutiques sont fréquemment observés suggérant la possibilité d'une sélection in vivo de mutants résistants aux antibiotiques. Plusieurs études chez *L. pneumophila* ont montré la facilité avec laquelle la résistance aux fluoroquinolones pouvait être sélectionnée in vitro. Les mécanismes génétiques impliquées dans les résistances sélectionnées *in vitro* correspondent à des mutations affectant les gènes codant pour l'ADN gyrase (*gyrA* et *gyrB*) et la topoisomérase IV (*ParC* et *parE*). De plus, les mutations *gyrA* localisées aux codons *gyrA83* surviennent précocement au cours de la sélection des résistances aux fluoroquinolones et sont responsables de résistance de haut niveau à ces antibiotiques.

Les *Legionella* sont des agents pathogènes occasionnels chez l'Homme et ont comme réservoir principal l'environnement aquatique. Il n'existe pas de porteurs sains chez l'Homme, ni de transmission interhumaine. Ces bactéries sont donc moins exposées à la pression antibiotique que les bactéries commensales de l'Homme et des animaux domestiques. A ce jour, une idée générale estimant que les résistances acquises n'existent pas chez les bactéries intracellulaires telles que les *Legionella* s'appuie sur l'absence actuelle d'isolement de tels mutants résistants naturels, en particulier en situation clinique.

Notre objectif était de confirmer la sélection in vivo de la résistance aux fluoroquinolones chez les patients atteints de légionellose traités par ces antibiotiques. Pour cela nous avons développé un test de PCR en temps réel (qPCRgyrALp) pouvant détecter les mutations ciblant les positions 241 à 263 de *gyrA*, correspondant aux acides aminés 81 à 88 du fragment QRDR de gène *gyrA* chez *L. pneumophila.* Nous avons optimisé ce test et confirmé sa spécificité en testant quatre souches de référence de *L. pneumophila* de sérogroupe 1 (Paris, Philadelphia, Lens, et Lorraine) ; trois mutants résistants aux fluoroquinolones reconstruits à

partir de *L. pneumophila sg1 Paris* (LPPI1 portant la mutation C248T conduisant à une substitution T83I, LPPI4 portant les mutations C248T et G259A et les substitutions D87N et T83I, et LPPI5 portant les mutations C248T et G259C et les substitutionsT83I et D87H) ; 26 souches de *Legionella* sensibles aux fluoroquinolones et appartenant à 17 espèces différentes; et 33 souches bactériennes n'appartenant pas au genre *Legionella*.

Ce test nous a permis, par analyse et comparaison des courbes de fusion, de différencier les souches mutantes des souches sauvages, et de prédire la position de la mutation *gyrA*. C'est un test spécifique de l'espèce *L. pneumophila*. Aucune amplification n'a été détectée pour les autres genres bactériens, et une très faible amplification a été obtenue pour les souches appartenant aux autres espèces du genre *Legionella* pour des inoculums bactériens très élevés seulement.

Nous avons testé 139 échantillons respiratoires provenant de 82 patients atteints de légionellose. Il s'agissait de cas confirmés et sporadiques admis à CHU de Grenoble entre 2006 et 2011. Le test qPCRgyrALp a pu amplifier un fragment de 259 pb de la région QRDR de *gyrA* de *L. pneumophila* de tous les échantillons respiratoires avec une charge bactérienne suffisante, en particulier un test de qPCR-mip positif. Les profils de la courbe de fusion correspondent à un type sauvage pour la plupart des échantillons respiratoires (t° de fusion de 59,34 + / - 0,41 ° C). En revanche, un pic de fusion plus faible (56,35 + / - 0,42° C) a été obtenu pour les échantillons respiratoires prélevés chez quatre patients atteints de légionellose (cas # 1 à # 4), suggèrant la présence d'une mutation *gyrA* 83 chez les souches de *L. pneumophila* infectant les patients correspondants.

Une souche de *L. pneumophila* sg 1 a été isolée uniquement chez les patients # 3 et # 4 au moment du diagnostic de la légionellose ; ces souches étaient sensibles aux fluoroquinolones d'après la détermination de leur CMI par technique du Etest (CMI=0.38pg/ml).

Pour confirmer la présence d'une mutation dans *gyrA* nous avons séquencé un fragment de 383 pb de ce gène. Les résultats n'étaient pas interprétables pour les prélévements du cas #1 soit deux échantillons collectés à l'admission à l'hôpital (D0, aspirations trachéale), et après trois jours (D3, aspirations trachéale) ; et du cas # 2 (deux échantillons respiratoires recueillis au moment de l'admission à l'hôpital (D0, expectoration), et après un mois d'hospitalisation (M1, aspiration trachéale). Pour le cas # 3, un seul échantillon d'expectoration recueilli pendant le séjour du patient en réanimation était disponible. Nous n'avons trouvé que des mutations silencieuses dans le QRDR aux positions C219G (codons 73) et C264T (codons 88) par rapport à la souche de référance *L. pneumophila Paris* et trois mésappariements aux positions (T278C, A281G, T285C) par rapport à la sonde d'ancrage. Pour le cas # 4, trois aspirations trachéales ont été recueillies le jour de l'admission à l'hôpital (D0), et après 3 jours

(D3) et 5 jours (D5) d'hospitalisation. Aucune mutation n'a été trouvée dans la séquence *gyrA* amplifiée à partir du premier échantillon clinique. En revanche, nous avons trouvé une mutation C248T entrainant une substitution T83I de GyrA pour les deux échantillons cliniques suivants.

La technologie de pyroséquençage à haut débit a été utilisée pour évaluer la présence de plusieurs allèles *gyrA* dans chacun des échantillons respiratoires humains, chez les patients présentant un test qPCRgyrALp en faveur d'une mutation du QRDR et chez trois patients contrôles présentant un profil de type « sauvage » en test qPCRgyrALp. Nous avons utilisé une plate-forme GS junior 454 (Roche Diagnostics, Meylan, France). De façon inattendue, nous avons détecté pour la première fois de faibles niveaux ($2,3 \times 10^{-4}$ à $1,9 \times 10^{-3}$) de mutants spontanés de *L. pneumophila gyrA83* C248T dans les échantillons prélevés avant administration d'une fluoroquinolone. Une fréquence de mutants *gyrA83* C248T de $3,7 \times 10^{-4}$ a été trouvée pour l'échantillon respiratoire recueilli chez le patient # 1 le jour de son hospitalisation. Pour le cas # 2, nous avons trouvé une fréquence de mutants *gyrA83* C248T de $2,9 \times 10^{-2}$ d'après quatre jours d'administration d'amoxicilline. Cette fréquence a augmenté à 94 % après un mois de traitement par les fluoroquinolones (lévofloxacine et d'azithromycine). Pour le cas # 3, nous avons confirmé l'absence des mutations *gyrA* aux codons 83 et 87, et la présence des mutations silencieuses au codons73 (C219 G, 88% des 17060 lectures) et 88 (C264T, 88,9 % des 17060 lectures). Pour le cas # 4, nous avons trouvé une fréquence de mutants *gyrA83* C248T de $1,05 \times 10^{-2}$ dans l'échantillon prélevé à l'admission. Ce patient avait été hospitalisé au préalable pendant 10 jours dans une unité d'hématologie où il avait reçu un traitement antibiotique (ciprofloxacine, ceftazidime et teicoplanine) en raison d'une pneumonie survenant au cours d'une phase d'aplasie medullaire. Ensuite, les fréquences des mutants *gyrA* C248T ont augmenté à 75% et 85 % respectivement après trois et cinq jours de traitement par la ciprofloxacine associée à l'érythromycine en réanimation. Les mutations combinées *gyrA*73 et *gyrA* 88 chez le patient n° 3 n'entrainent pas de substitution d'acides aminés dans la protéine GyrA et donc ne semblent pas pouvoir être associées à une résistance aux fluoroquinolones. D'après le travail que nous avons publié antérieurement, la mutation *gyrA83* C248T peut être considérée comme associée à une résistance de haut niveau à ces antibiotiques. Nous avons corrélé la présence de cette mutation avec une évolution défavorable chez les patients # 2 et # 4. La patient # 2 a été admis en réanimation en raison d'une pneumonie sévère. Il a reçu une association d'amoxicilline-acide clavulanique, mais pas de fluoroquinolone avant l'admission à l'hôpital. Il a guéri après une administration de lévofloxacine et d'azithromycine. Cependant, il a passé 31 jours en réanimation et 79 jours au total à l'hôpital. Il a souffert également d'une surinfection

pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* lors de son séjour en réanimation. Le patient # 4 a été traité avec la combinaison de la ciprofloxacine à l'érythromycine. Son séjour à l'hôpital a été de 32 jours, dont 6 jours en réanimation.

Chez deux patients (cas # 2 et # 4), nous avons pu montrer un remplacement de la population sensible de *L. pneumophila* par une population portant une mutation *gyrA83* connue pour être associée à une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones. Cette mutation a été retrouvée globalement chez 2 (3,3%) des 60 patients pour lesquels la technique de qPCRgyrALp sur prélèvement respiratoire a permis d'obtenir un résultat, soit 3 (4.7%) des 65 échantillons respiratoires étudiés. On peut supposer que l'hospitalisation prolongée de ces patients était liée à une mauvaise efficacité des fluoroquinolones, mais que la guérison est survenue du fait de l'administration concomitante d'un macrolide.

Perspectives

Dans cette étude, nous avons prouvé la possibilité de sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones chez *L. pneumophila* dans une cohorte limitée de patients atteints de légionellose et traités par une molécule appartenant à cette classe d'antibiotiques. Nous n'avons étudié dans ce travail que les mutations majeures affectant le gène *gyrA* et responsables de la résistance aux fluoroquinolones chez les bactéries à Gram négatif, notamment *L. pneumophila* (Almahmoud, et al. 2009). Cependant nous avons montré chez des mutants résistants sélectionnés *in vitro* la possibilité de mutations affectant d'autres gènes codant les topoisomérases chez cette espèce (Almahmoud, et al. 2009). Il serait donc intéressant de développer des tests moléculaires détectant ces résistances afin de vérifier leur présence éventuelle *in vivo*, de façon isolée ou associée aux mutations *gyrA*. A noter que nos tentatives d'amplifier les gènes *gyrB* à partir de prélèvements respiratoires des patients porteurs des mutations *gyrA* n'ont pas permis de découvrir des mutations dans ce gène, alors que les essais d'amplification du gène *parC* à partir de ces prélèvements ont échoué.

Dans un deuxième temps, il nous faudra préciser l'incidence réelle de ces mutations en étudiant une cohorte plus importante de patients atteints de légionellose et présentant une réponse clinique partielle au traitement par une fluoroquinolone. Compte tenu de la relative rareté des formes graves de légionellose, ce type d'étude nécessitera une approche multi-centrique, en collaboration avec le Centre National de Référence des *Legionella*.

Enfin, il sera nécessaire également d'étudier l'impact réel de ces résistances sélectionnées in vivo sur l'évolution clinique et le pronostic des patients. Cette analyse sera vraisemblablement

difficile, en particulier parce que la plupart des patients hospitalisés pour légionellose grave reçoivent actuellement une bi-antibiothérapie.

L. pneumophila représente un exemple de bactéries intracellulaires peuvant développer une résistance aux antibiotiques (en particulier aux fluoroquinolones) *in vivo*. Ces résistances représentent une réponse adaptative à une pression de sélection, comme on peut l'observer pour la plupart des bactéries responsables d'infections humaines. Toutefois l'émergence de ces résistances *in vivo* peut rester masquée du fait de l'absence de propagation de ces mutants résistants hors de l'hôte infecté. En effet, il n'existe pas pour la légionellose de transmission interhumaine, et l'infection humaine est une impasse évolutive pour *Legionella* qui a peu de chance de pouvoir rejoindre son réservoir aquatique naturel. Ce cycle de vie explique probablement l'absence d'isolement de mutants résistants aux antibiotiques chez *L. pneumophila* jusqu'à ce jour, et la nécessité d'utiliser des tests moléculaires pour mettre en évidence l'émergence de tels mutants directement dans les prélèvements humains. Nous pensons que ce concept de résistance *in vivo* masquée est vraisemblablement extrapolable à d'autres pathogènes humains possédant une niche écologique réduite, avec des possibilités limitées de transmission entre les réservoirs humains, animaux et/ou environnementaux, ce qui est le cas de nombreuses espèces bactériennes à multiplication intracellulaire stricte ou facultative. Ce travail a été rédigé sous la forme d'un article court de type « Science Report ».

Title: Hidden Selection of Bacterial Resistances to Antibiotics in Humans: the *Legionella* Paradigm

Authors: Lubana Shadoud [1-3], Iyad Almahmoud[1-3] , Sophie Jarraud[4-7], Jérôme Etienne[4-7], Sylvie Larrat[1,8], Jean-François Timsit[1,9,10], Dominique Schneider[1,2], Max Maurin[1-3]

Affiliations:

[1] Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

[2] CNRS UMR 5163, LAPM, Grenoble, France

[3] CHU de Grenoble, Institut de Biologie et de Pathologie, Grenoble, France

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

[5] CNRS UMR5308, Lyon, France

[6] Inserm U1111, Lyon, France.

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

[8] UVHCI, UMI 3265, UJF/EMBL/CNRS, Grenoble, France

[9] CHU de Grenoble, Réanimation Médicale, Grenoble, France

[10] INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

One-sentence summary: We provide evidence that *Legionella pneumophila* can develop resistance to fluoroquinolones *in vivo* in legionellosis patients treated with these antibiotics.

Keywords: *Legionella pneumophila*, legionellosis, antibiotic resistance, *in vivo* resistance, intracellular bacteria, real-time PCR

Corresponding author: Pr. Max Maurin, Université Grenoble Alpes, CHU de Grenoble, Institut de Biologie et de Pathologie, 38043 Grenole, cedex 9, France. 33 4 76 76 95 94 ; mmaurin@chu-grenoble.fr

Abstract

The emergence of antibiotic resistance is a major public health concern. However, such adaptive evolution has not been described for a number of intracellular human pathogens with animal or environmental reservoirs. We examined 139 respiratory specimens sampled over time from 82 patients with Legionnaire's disease, using real-time PCR and deep-sequencing methods. We showed for the first time the development of resistance to fluoroquinolones in *Legionella pneumophila* in infected patients treated with these antibiotics. As human infection is an evolutionary dead-end for *L. pneumophila*, as for many other intracellular pathogens, these resistant mutants have poor ability to spread outside the infected hosts. However, these hidden resistances must be taken into account in the control of the gradual loss of effectiveness of antibiotics.

Main Text:

A huge literature describes acquired antibiotic resistance in bacterial human pathogens, with a recent emphasis on multi-drug resistant (MDR) bacteria (*1*). The resistance genetic determinants and their horizontal transfer among bacterial species have been extensively characterized (*2*, *3*), including the spread of MDR bacteria between the human, animal and environmental reservoirs (*2*). In contrast, acquired antibiotic resistance remains the exception in many bacterial species with strict or facultative intracellular lifestyles, including *Rickettsia* sp. (*4*), *Coxiella burnetii* (5), *Ehrlichia* sp. (6), *Chlamydia psittaci* (7), *Legionella pneumophila* (8), *Francisella tularensis* (9) and *Brucella melitensis* (10). Most of these occasional human pathogens inhabit natural environmental and/or animal reservoirs, are usually not carried by humans, and are not directly transmitted among humans. Therefore, it is generally assumed that acquired antibiotic resistance very rarely, if ever, occurs in these pathogens, and indeed no or very few isolates with acquired resistances have been isolated so far.

Here we identified the *in vivo* emergence of fluoroquinolones-resistant mutants of *L. pneumophila* in patients treated with these antibiotics for legionellosis. *L. pneumophila* is a Gram-negative facultative intracellular bacterium that multiplies in aquatic environments, especially in free-living protozoa and biofilms (11,12). Legionellosis (Legionnaires' disease) is an acute pneumonia caused by the inhalation of aerosols containing *Legionella*, with the *L. pneumophila* serogroup (sg) 1 accounting for > 90% of human infections worldwide (11,12). Severe legionellosis is usually reported in patients with delayed diagnosis and treatment and/or altered immune status (13), with mortality rates between 10 and 30% (14,15). Macrolides and fluoroquinolones are the main antibiotic classes used as first-line treatment (16). Although no acquired resistance has been characterized in *Legionella* species (14–16),

resistance to fluoroquinolones, macrolides or rifampicin is readily selected *in vitro* in *L. pneumophila* (8,17–19).

We studied a cohort of 82 unrelated cases of legionellosis (20), from whom 139 respiratory samples were collected during hospitalization, including 13 before and 79 after the start of fluoroquinolone therapy, respectively, the remaining 47 for which no antibiotic administration was specified. Legionellosis diagnosis was confirmed by a positive urinary antigen test (UAT) for *L. pneumophila* sg1 (Binax Now *Legionella*, Binax, Portland, USA) in all 82 patients and isolation of *L. pneumophila* sg 1 from respiratory samples collected before any fluoroquinolone therapy in 15 patients. All these *L. pneumophila* strains were susceptible to fluoroquinolones as evidenced by low MICs (0.25-0.38 mg/L) and lack of mutation in the topoisomerase II-encoding genes.

Based on our previous studies of *in vitro* selection of fluoroquinolone resistant mutants in *L. pneumophila* (8,20), we developed a real-time PCR assay (hereafter, qPCRgyrALp) to investigate whether fluoroquinolone resistance mutations occurred in *L. pneumophila* directly in legionellosis patients treated with these antibiotics. We first standardized our assay with 67 strains, including four *L. pneumophila* reference strains, three fluoroquinolone-resistant mutants that we previously obtained (8), 26 strains from other *Legionella* species and 33 strains from other genera (20) (Tables S1, S2 and S3). Our assay allowed us to detect mutations occurring in *gyrA*, the gene encoding the subunit A of gyrase which is one of the fluoroquinolone targets, at nucleotide positions 241 to 263 corresponding to amino acids 81 to 88 of the GyrA Quinolone Resistance Determining Region (QRDR).

The qPCRgyrALp assay was then applied to 139 respiratory samples obtained from the 82 patients of the cohort (Figure 1). This test allowed amplification of the *gyrA* QRDR

from 115 respiratory samples collected in 64 patients with (n=33) or without (n=9) fluoroquinolone therapy, or with unknown treatment status (n=22). As compared to controls (20) (Figures S1 and S2), the melting curve profiles suggested a wild-type *gyrA* QRDR for respiratory samples collected in 60 patients (mean melting peak +/- SD, 59.34 +/- 0.41°C). In contrast, for respiratory samples from four legionellosis patients (referred as #1 to #4), the qPCRgyrALp test yielded a mean +/- SD melting peak of 56.35 +/- 0.42°C (3 replicates per patient) suggesting the presence of *gyrA* QRDR mutants. These positive samples were collected three days after legionellosis diagnosis (D3) for patient #1, at D31 for patient #2, D0 for patient #3, and D2 and D5 for patient #4. It is to be noted that, among the 15 fluoroquinolones-susceptible *L. pneumophila* sg 1 isolates obtained from the patients' cohort, two were isolated in patients #3 and #4 at the time of legionellosis diagnosis. *Legionella* cultures were negative for other respiratory samples collected in these four patients, precluding evaluation of acquired resistance to fluoroquinolones in the involved strains.

To confirm *in vivo* selection of fluoroquinolones resistant mutants, we tried to PCR-amplify and sequence a 383-bp fragment of the *L. pneumophila gyrA* QRDR directly from the respiratory samples collected from patients # 1 to #4 (Figure 2). No *gyrA* sequence could be amplified for patient #1. We suspected that *L. pneumophila* DNA load was too low (i.e., less than 10^3 GU/test for samples D0 and D3) for direct amplification from the corresponding samples. Alternatively, *L. pneumophila* DNA could have been altered during prolonged storage of these clinical samples at -80°C. For patient #3, two silent mutations C219G (codon 73) and C264T (codon 88) were found in the *gyrA* QRDR amplified from the respiratory sample collected at D0. However, these two mutations occurred outside of the nucleotide positions which hybridized to the sensor probe of the qPCRgyrALp test, and thus could not explain the observed decrease in the melting peak. This one could be explained by three mismatches found on the portion of the *gyrA* QRDR (T278C, A281G, and T285C) that

hybridized with the anchor probe of the qPCRgyrALp test. For patients #2 and # 4, a wild-type *gyrA* QRDR was amplified from sample D0. In contrast, a C248T mutation resulting in a GyrA T83I substitution was found for samples collected at D31 for patient #2, and at D2 and D5 for patient #4. Thus, *in vivo* selection of fluoroquinolones resistant mutants was highly suspected in these two patients.

To further explore the presence and frequency of *L. pneumophila gyrA* QRDR mutants, we analysed respiratory samples from patients # 1 to #4 using next generation sequencing methodology. We tested in parallel qPCRgyrALp-negative respiratory samples from three control patients. Unexpectedly, we detected low levels ($2.3\ 10^{-4}$ to $1.9\ 10^{-3}$) of *L. pneumophila gyrA83* mutants (C248T, T83I) in respiratory samples collected in control patients before administration of any fluoroquinolone. The spontaneous occurrence of fluoroquinolones resistant mutants has been previously described in other Gram-negative bacteria, including *Escherichia coli* (21), but never in *Legionella* species. A similar frequency of *gyrA83* mutants ($3.7\ 10^{-4}$) was found for patient #1 at D0, whereas the NGS test failed for sample D3. For patient #2, we found a *gyrA83* mutants frequency of $2.9\ 10^{-2}$ at D0, while the patient had already received four days of amoxicilline therapy. This frequency increased to 94% after one month of levofloxacin and azithromycin therapy (D31 sample). For case # 3, we confirmed the lack of *gyrA* mutation at codon positions 83 and 87, but the nucleotidic changes as compared to the Paris strain at codon positions 73 (C219 G**,** 85.7% of the 17060 reads), 88 (C264T, 85.7% of the 17060 reads) and 95 (T285C, 85.7% of 17060 reads). For case # 4, we found a *gyrA83* mutants frequency of $1.05\ 10^{-2}$ in the respiratory sample collected at D0. At that time, the patient had been hospitalized for 10 days in a hematologic unit and had received a three-day course of antibiotic therapy (ciprofloxacin, ceftazidime and teicoplanine) because of aplasia and pneumonia. Then, the frequencies of *gyrA* mutants increased to 75% and 85% at D2 and D5, respectively, while the patient was receiving ciprofloxacin and erythromycin therapy in the intensive care unit. The presence of a high load

of *gyrA83* (patients #2 and 4) mutants in respiratory samples well explains the melting curve profiles we obtained with the qPCRgyrALp assay owing to altered hybridization of the sensor probe. For patient #3, mismatches at nucleotidic positions corresponding to the anchor probe of the qPCRgyrALP test probably explained the shift in the melting peak. The presence of *gyrA* QRDR mutants of *L. pneumophila* could not be confirmed in patient #1 because of our inability to amplify and sequence this DNA region directly from the patient's respiratory samples, probably because of low DNA load.

Although occurring in the *gyrA* QRDR, the combined mutations *gyrA73+88* were not considered associated with resistance to fluoroquinolones because they did not induce any amino acid substitution in the GyrA protein. In contrast, we previously demonstrated that the *gyrA83* mutation leading to T83I substitution in GyrA was associated with a fourfold increase in fluoroquinolones MICs for *L. pneumophila* Paris strain (8). This mutation is well known to be associated with high-level resistance to fluoroquinolones in many Gram-negative bacteria (20,22). We tried to correlate the presence of such a mutation with a more severe course of legionellosis in patients #2 and #4 (Figure 3). Case #2 was admitted to the intensive care unit (ICU) of Grenoble University Hospital because of severe pneumonia. He received amoxicilline-clavulanate combination but no fluoroquinolone before hospital admission. He recovered from legionellosis under levofloxacin and azithromycin therapy. However, he spent 31 days in the ICU and 79 days in total in the hospital. He also suffered from pulmonary superinfection with *Pseudomonas aeruginosa* during his stay in the ICU. Case #4 was treated with the combination of ciprofloxacin and erythromycin. His hospital stay was 32 days, including 6 days in ICU. Although both patients suffered from severe and prolonged course legionellosis, further cases would be needed to allow statistical comparison of severity of cases with or without detectable *gyrA* QRDR mutant strains of *L. pneumophila*.

Until now, it was commonly assumed that *L. pneumophila* could not develop resistance to fluoroquinolones, mainly because no mutant with acquired resistance to these antibiotics had been isolated from clinical or environmental samples (23–25). It has been speculated that the release of man-made antibiotics into the environment may promote the emergence of new antibiotic-resistant bacterial lineages (26), but this has never been demonstrated for *Legionella* species. Here we demonstrate, using a modern molecular approach, that *L. pneumophila* can develop resistance to fluoroquinolones when exposed to these antibiotics *in vivo*. In two patients, we could demonstrate infection with a fluoroquinolone-susceptible population of *L. pneumophila*, and subsequent occurrence of high load of fluoroquinolone-resistant *gyrA83* mutants. By constructing a same *gyrA83* mutant in *L. pneumophila* Paris, we previously demonstrated that GyrA T83I substitution is associated with high-level resistance to fluoroquinolones in this species (8). Thus, it is likely that prolonged hospitalization of these patients was related to poor efficacy of the fluoroquinolone antibiotic, but patients recovered from legionellosis because of concomitant administration of a macrolide. Interestingly, during hospitalisation of case # 4 in the intensive care unit, the *L. pneumophila* DNA load in respiratory samples remained stable under fluoroquinolone therapy while the percentage *gyrA* mutants was increasing, showing that fluoroquinolones susceptible population of bacteria was progressively replaced by a fluoroquinolones resistant one (Figure 4). This is a clear demonstration that selection of fluoroquinolones resistant mutants occurred *in vivo* during hospitalization, while the patient was under fluoroquinolone therapy. It remains to be explained why such resistant mutants have never been isolated so far in clinical situations. A probable explanation is that such mutants are very difficult to grow from respiratory samples collected in patients under antibiotic therapy. Moreover, they have poor ability to propagate outside the infected host because of lack of human-to-human transmission and poor opportunity to return to the natural environmental reservoir of these bacteria.

In conclusion, we have demonstrated that *in vivo* selection of *gyrA* mutations responsible for fluoroquinolones resistance in *L. pneumophila* occur in patients infected with this pathogen and treated with these antibiotics. In this study, we found high level of *L. pneumophila gyrA83* mutants in 2 (3.1%) of 64 patients for which the qPCRgyrALp assay could detect and analyze a *L. pneumophila gyrA* QRDR, corresponding to 2/33 (6%) patients with known fluoroquinolone therapy at the time of respiratory sample collection. We did not check clinical samples for the presence of mutations involving other topoisomerases encoding genes, although we have previously shown that such mutations could be selected in vitro (8). Thus, the incidence of *in vivo* selection of fluoroquinolones resistance in *L. pneumophila* may be higher than that reported in this study. A further step would be to better define the prevalence of fluoroquinolones resistant mutants in legionellosis patients and their clinical consequences, especially in terms of increased length of hospitalization and fatality. We recommend development and use of molecular tools to test the presence of *L. pneumophila* mutants resistant to fluoroquinolones in infected patients, especially in case of poor response to antibiotic treatment. Furthermore, the demonstration of *in vivo* selection of fluoroquinolones resistant mutants of *L. pneumophila* fully justifies the current practice of administration of a combined antibiotic therapy in severe legionellosis cases (27). We think *L. pneumophila* is a paradigm of *in vivo* adaptation to antibiotic pressure of a number of intracellular bacterial species. These hidden resistances should be further explored because they certainly contribute to the gradual loss of effectiveness of antibiotic treatments.

ACKNOWLEDEMENTS

The authors thank the Damascus University (Damascus, Syria) for financial support of a PhD fellowship (LS), and Katia Fusiller and Jeanne Noelle Del Bano for technical assistance.

REFERENCES

1. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013 Mar;11(3):297–308.

2. Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. Science. 2008 Jul 18;321(5887):365–7.

3. Skippington E, Ragan MA. Lateral genetic transfer and the construction of genetic exchange communities. FEMS Microbiol Rev. 2011 Sep;35(5):707–35.

4. Rolain JM, Raoult D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in the Rickettsia genus. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1063:222–30.

5. Rouli L, Rolain J-M, El Filali A, Robert C, Raoult D. Genome sequence of Coxiella burnetii 109, a doxycycline-resistant clinical isolate. J Bacteriol. 2012 Dec;194(24):6939.

6. Maurin M, Abergel C, Raoult D. DNA gyrase-mediated natural resistance to fluoroquinolones in Ehrlichia spp. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Jul;45(7):2098–105.

7. Binet R, Maurelli AT. Frequency of development and associated physiological cost of azithromycin resistance in Chlamydia psittaci 6BC and C. trachomatis L2. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Dec;51(12):4267–75.

8. Almahmoud I, Kay E, Schneider D, Maurin M. Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in Legionella pneumophila. J Antimicrob Chemother. 2009 Aug;64(2):284–93.

9. Sutera V, Levert M, Burmeister WP, Schneider D, Maurin M. Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in Francisella species. J Antimicrob Chemother. 2013 Aug 20;

10. Ravanel N, Gestin B, Maurin M. In vitro selection of fluoroquinolone resistance in Brucella melitensis. Int J Antimicrob Agents. 2009 Jul;34(1):76–81.

11. Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila. Clin Microbiol Rev. 2010 Apr;23(2):274–98.

12. Carratalà J, Garcia-Vidal C. An update on Legionella. Curr Opin Infect Dis. 2010 Apr;23(2):152–7.

13. Yu H, Higa F, Koide M, Haranaga S, Yara S, Tateyama M, et al. Lung abscess caused by Legionella species: implication of the immune status of hosts. Intern Med Tokyo Jpn. 2009;48(23):1997–2002.

14. Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S, Jarraud S, Campèse C, Bissery A, et al. Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. Eur Respir J. 2012 Apr;39(4):963–70.

15. Jespersen S, Søgaard OS, Schønheyder HC, Fine MJ, Ostergaard L. Clinical features and predictors of mortality in admitted patients with community- and hospital-acquired legionellosis: a Danish historical cohort study. BMC Infect Dis. 2010;10:124.

16. Pedro-Botet ML, Yu VL. Treatment strategies for Legionella infection. Expert Opin Pharmacother. 2009 May;10(7):1109–21.

17. Jonas D, Engels I, Hartung D, Beyersmann J, Frank U, Daschner FD. Development and mechanism of fluoroquinolone resistance in Legionella pneumophila. J Antimicrob Chemother. 2003 Feb;51(2):275–80.

18. Nielsen K, Hindersson P, Hoiby N, Bangsborg JM. Sequencing of the rpoB gene in Legionella pneumophila and characterization of mutations associated with rifampin resistance in the Legionellaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Oct;44(10):2679–83.

19. Nielsen K, Bangsborg JM, Høiby N. Susceptibility of Legionella species to five antibiotics and development of resistance by exposure to erythromycin, ciprofloxacin, and rifampicin. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000 Jan;36(1):43–8.

20. Materials and methods and supplementary figures and tables are available as supporting material on Science Online.

21. Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in Escherichia coli isolates from patients with urinary tract infections. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Oct;47(10):3222–32.

22. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2005 Jul 15;41 Suppl 2:S120–126.

23. Gómez-Lus R, Adrián F, del Campo R, Gómez-Lus P, Sánchez S, García C, et al. Comparative in vitro bacteriostatic and bactericidal activity of trovafloxacin, levofloxacin and moxifloxacin against clinical and environmental isolates of Legionella spp. Int J Antimicrob Agents. 2001 Jul;18(1):49–54.

24. García MT, Pelaz C, Giménez MJ, Aguilar L. In vitro activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of Legionella pneumophila: influence of charcoal on susceptibility test results. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Aug;44(8):2176–8.

25. Onody C, Matsiota-Bernard P, Nauciel C. Lack of resistance to erythromycin, rifampicin and ciprofloxacin in 98 clinical isolates of Legionella pneumophila. J Antimicrob Chemother. 1997 Jun;39(6):815–6.

26. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2010 Sep;74(3):417–33.

27. Roig J, Rello J. Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. J Antimicrob Chemother. 2003 May; 51(5):1119–29.

28. ECDC. Commission Implementing Decision 2012/506/EU of 8 August 2012, amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. 2012.

29. Maurin M, Hammer L, Gestin B, Timsit JF, Rogeaux O, Delavena F, et al. Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Apr; 16(4):379–84.

30. Bruin JP, IJzerman EPF, den Boer JW, Mouton JW, Diederen BMW. Wild type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical Legionella pneumophila serogroep 1 isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2012;72:103–8.

FIGURES

Figure 1. Real time PCR investigations or respiratory samples collected in legionellosis patients. qPCR-mip and qPCRgyrALp: detection of the *mip* gene and *gyA* QRDR of *L. pneumophila*, respectively; NGS; next generation or high-throughput sequencing.

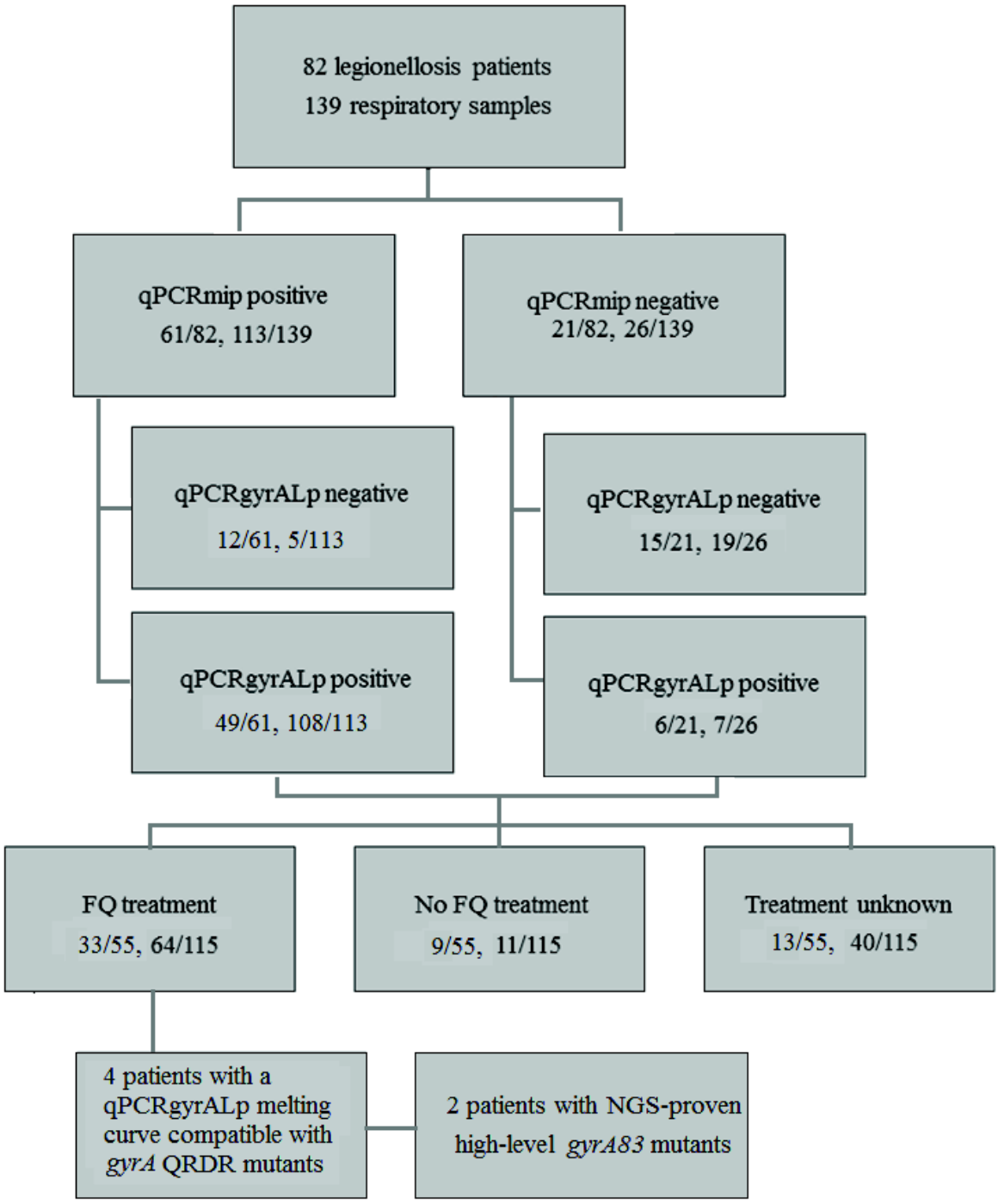


Figure 2. Melting curves obtained with the qPCRgyrALp test for the wild-type *L. pneumophila* Paris strain and for respiratory samples of patients # 1 to 4.

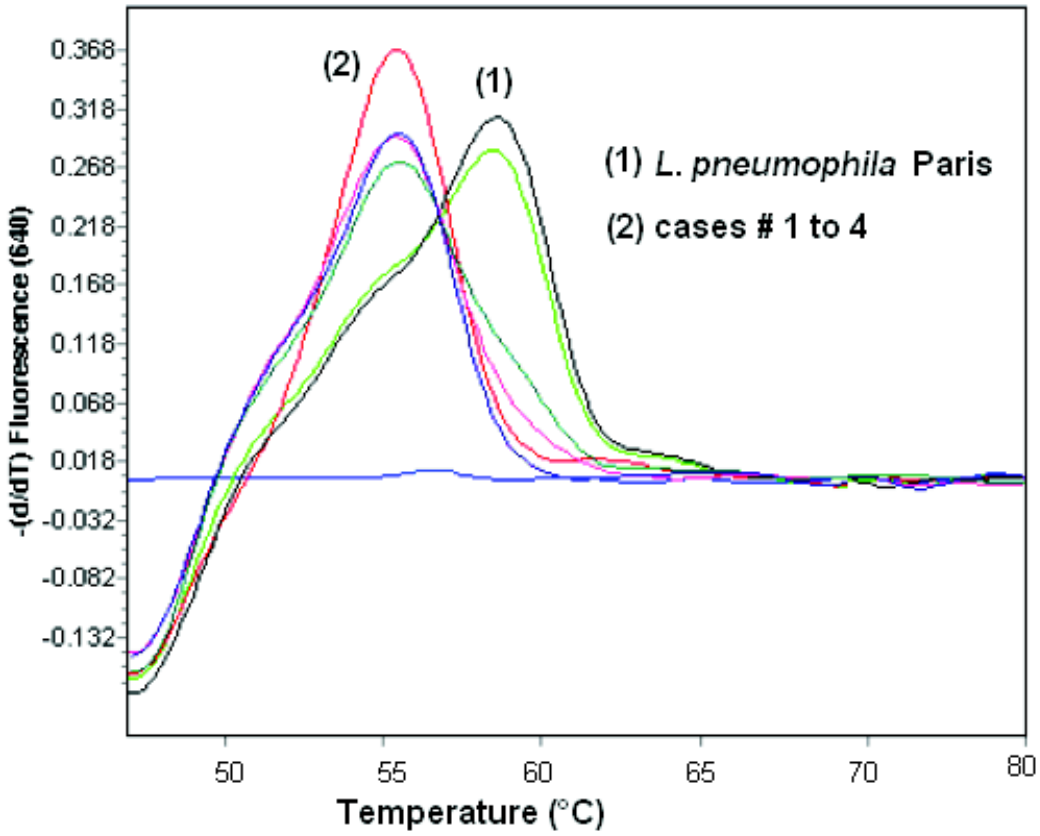
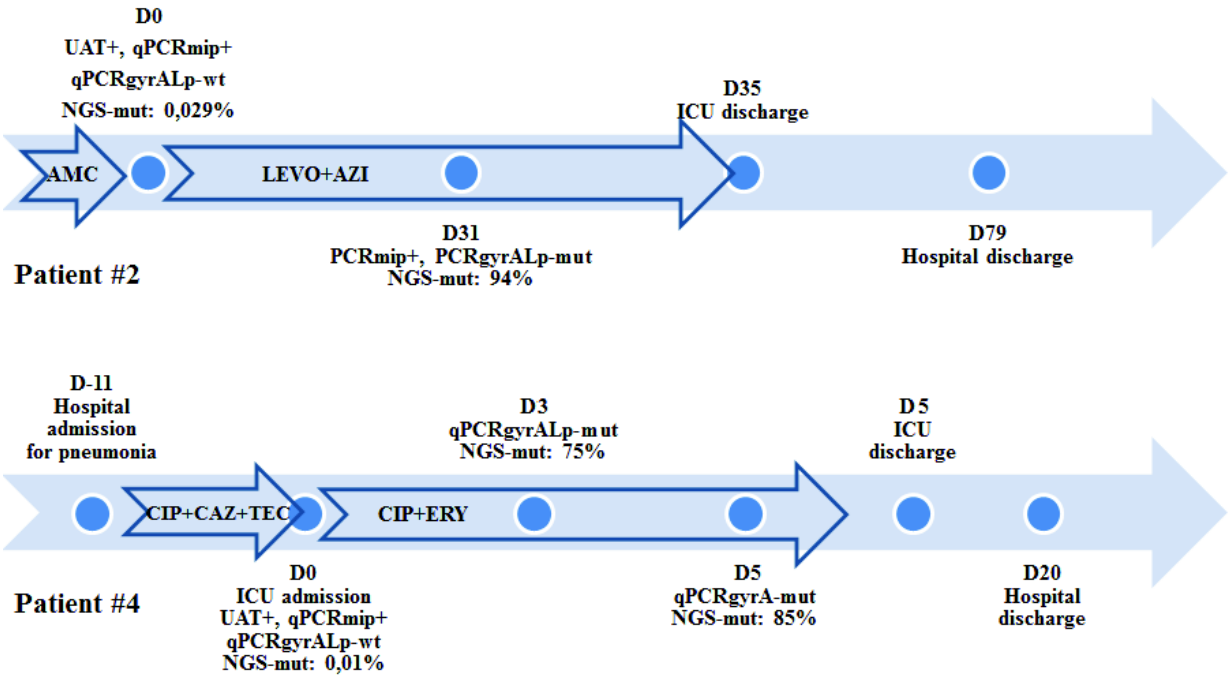


Figure 3. Clinical course and genetic findings in patients #2 and #4



D: days number before/after legionellosis diagnosis using the urinary antigen test (UAT)

Fluoroquinolones: **LEVO**, levofloxacin; **CIP**, ciprofloxacin

Macrolides: **AZI**, azithromycin; **ERY**, erythromycin

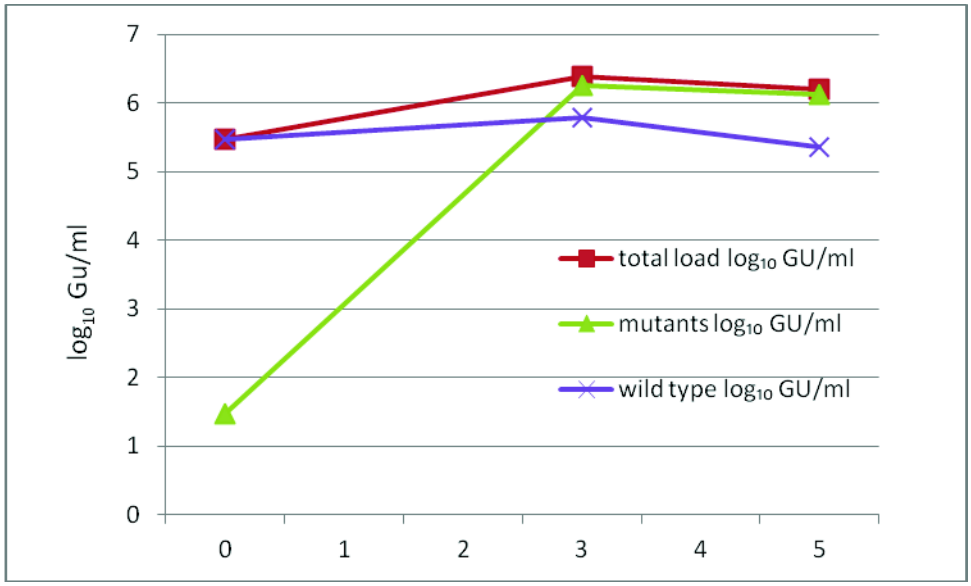
Other antibiotics: **AMC**, amoxicillin-clavulanate; **CAZ**, ceftazidime; **TEC**, teicoplanine

qPCR-mip +: positive qPCR-mip test in respiratory samples

qPCRgyrALP-neg/wt/mut: qPCRgyrALp test either negative (neg), positive with a wild type (wt) melting curve, or with a melting curve compatible with *gyrA* QRDR mutants (mut).

NGS-mut: % of *gyrA* mutants (*C248T*; T83I) as determined by next generation sequencing

Figure 4. *L. pneumophila* load in respiratory samples of patient # 4, and relative amount of *gyrA* wild-type and mutant strains, as determined by the combination of qPCR-mip and next generation sequencing methods, during the stay in the intensive care unit (ICU).



SUPPLEMENTARY MATERIALS

MATERIAL AND METHODS

Patients and clinical samples

We studied a cohort of 82 unrelated legionellosis patients (64 males, 18 females, mean age 55 years, and age range 27-97 years) admitted to Grenoble University hospital between 2006 and 2011. For diagnostic purposes, 139 respiratory samples were collected from these patients during hospitalization, including 13 before and 79 after the start of fluoroquinolone therapy, respectively, the remaining 47 for which no antibiotic administration was specified. According to criteria of the European Centre for Disease Prevention and Control (28), the legionellosis diagnosis was confirmed by the combination of clinical and radiologic signs of pneumonia together with a positive urinary antigen test (UAT) for *L. pneumophila* sg1 (Binax Now *Legionella*, Binax, Portland, USA) in all patients, and isolation of a *L. pneumophila* strain from respiratory samples in 15 patients (18.3% of the cohort patients). Additionally, a real-time PCR test (qPCR-mip) (29) allowed detection and quantification of *L. pneumophila* DNA in respiratory samples in 63/82 (75.8%) patients and 113/139 (81.3%) samples , with a bacterial load at the time of legionellosis diagnosis varying from 14.5 genome units (GU) to 1.7 x 10^6 GU per test (5µL DNA extract).

Bacterial strains

We used four reference strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (sg1): Paris (CIP 107629T), Philadelphia (ATCC 33152), Lens (CIP 108286) and Lorraine (CIP 108729) (Table S1). We also used 27 fluoroquinolones-susceptible *Legionella* strains belonging to 17 *Legionella* species other than *L. pneumophila* (Table S1). All *Legionella* strains were kindly provided by S. Jarraud and J. Etienne at the National Reference Center for *Legionella* (Lyon, France), except *L. drancourtii* (ATCC 50991, formerly LLAP12) which was a gift from B. La Scola (URMITE, Marseille, France).

Three fluoroquinolones-resistant mutant strains previously constructed in our laboratory from *L. pneumophila sg1* Paris were used (8). These strains harboured mutations in the quinolone resistance determining region (QRDR) of the *gyrA* gene, encoding the sub-unit A of DNA gyrase: LPPI1 (*gyrA* C248T mutation leading to GyrA T83I substitution), LPPI4 (C248T and G259A, T83I and D87N), and LPPI5 (C248T and G259C, GyrA T83I and D87H) (8). The type II topoisomerases (DNA gyrase and topoisomerase IV), which are the main targets of fluoroquinolones, are enzymes that control the topological structure of DNA and thus many stages of the bacterial lifecycle, including DNA replication and transcription (22). In Gram negative bacteria, acquired resistance to fluoroquinolones is most often related to mutations in the *gyrA* QRDR, leading to amino acid substitution in the corresponding GyrA protein and its subsequent reduced affinity for the fluoroquinolone compound (22). We previously demonstrated that *in vitro* selection of fluoroquinolones resistance in *L. pneumophila* Paris was related to progressive accumulation of mutations in type II topoisomerases genes, and that the mutation leading to T83I substitution in GyrA both occurred very early during the selection process and was associated with high-level resistance to fluoroquinolones (8).

Finally, 33 bacterial strains not belonging to *Legionella* species and occasionally isolated from human respiratory samples were used for specificity tests (Table S2). These were either reference strains purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) or clinical strains isolated in our laboratory and identified using phenotypic and genetic methods (16S rRNA gene amplification and sequencing). *Legionella* strains were grown on buffered charcoal yeast extract agar plates (BCYE; Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), at 37°C for 48-72 h. The other bacteria were grown on standard culture media, including Columbia blood agar supplemented with 5% Polyvitex and Chocolate agar (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France).

Antibiotic susceptibility testing

MICs of several antibiotics against *Legionella* strains were determined using the E-test method (bioMérieux). A bacterial inoculum of 1 McFarland turbidity standard was prepared in Brain-Heart infusion broth (BHI broth, bioMérieux), and platted on a BCYE agar plate. The E-test strip was applied after the agar plate had dried, and the plate was incubated at 35 ± 2°C, in 5% Co2 atmosphere, for 3-5 days. The MIC was read directly on the strip at the inhibitory zone edge intersection (30).

DNA extraction

For bacterial cultures, a 0.5 McFarland bacterial inoculum was prepared in phosphate-buffered saline. DNA extraction and purification was done using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's recommendations.

The respiratory samples were first liquefied by incubation at room temperature for 15 min in the presence (vol/vol) of Digest-EUR ® (Eurobio, Courtaboeuf, France). Samples were then washed twice by centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes and resuspension of the pellet in 2 ml PBS. DNA was then extracted and purified from each sample using QIAamp DNA mini kit.

***Legionella gyrA* amplification and sequencing**

Our goal was to design primers and probes allowing detection of mutations occurring in the *gyrA* QRDR of *L. pneumophila,* using real-time PCR technology. Because the *gyrA* gene sequence was available only for a few *Legionella* species and strains, we first decided to amplify and sequence a 383-bp region of the *gyrA* QRDR of 14 strains belonging to nine different *Legionella* species other than *L. pneumophila* (Table S1). The PCR amplification mixture included: 2 µl of a 10 pmol/µl suspension for each primer LgyrALubS7 (5'-GCGATGAGTGTCATTGTAG-3') and LgyrALubASR2bis (5'-

GTTTCATCATAGTTAGGGCTAAAATCAAC-3'); 25 µl of Pwomaster® (Roche diagnostics, Meylan, France); 5 µl of template DNA; and 16 µl of PCR-grade water. The amplification program included initial denaturation at 94°C for 2 min; followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min.

qPCRgyrALp assay

A multiple alignment of *gyrA* gene sequences available in GenBank database or determined in our laboratory for different *Legionella species* was then performed using ClustalW software (NCBI, National Library of Medicine, Bethesda, USA). Primers and probes for the real-time PCR assay allowing detection of *gyrA* QRDR mutations in *Legionella* species (referred as qPCRgyrALp assay) were designed using Primer 3 software (NCBI). The selected forward and reverse primers were LpgyrALSFw (5'- CCTGATGTACGTGATGGTTTAA-3') and LpgyrALSRv (5'- GCATGGCAGCTGGAGCATCTCC-3'). They allowed amplification of a 259 bp fragment of the *gyrA* QRDR. The dual probes were LPgyrALSP1 (5'-GGGGATACAGCTGTTTATGACAC- Fluo-3') and LpgyrALSP3 (5'-LCRed640-TTGTTCGTATGGCTCAGCCTTTTTC-P-3'). LPgyrALSP1 was the sensor probe, and allowed detection of nucleotide changes at positions 241 to 263 corresponding to amino acids 81 to 88. The anchor probe LpgyrALSP3 was designed to hybridize a DNA segment 2 bp close to the sensor probe. Because of some genetic variability in this specific DNA region, it was designed to match optimally with all tested *L. pneumophila* strains.

The qPCR conditions were optimized for annealing temperature and MgCl2 concentration. For each assay, A 20 µL PCR reaction mixture was prepared by adding 2 µl of Light Cycler® Fast StartDNA Master Hybprobe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) reaction mix, 3 µL of MgCl2 at 25mMol/L, 1 µL of each primer suspension at 10 pmol/µl, 1µL of the sensor probe at 4 pMol/µL, 2 µL of the anchor probe at 4 pMol/µL, 0.5 µl of Uracil-DNA Glycosylase (UDG, 0.5U), 5 µl of template DNA and 4.5 µl of PCR-grade water. The PCR

program included the following steps: activation of the UNG at 94°C for 2 min; 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 sec, annealing at 55°C for 10 sec and extension at 72°C for 15 sec; and a final extension step at 72°C for 1 min. Then, melting curves were constructed by lowering the temperature to 47°C, and raising the temperature by 0.1°C/sec to 95°C while measuring continuously the fluorescence intensity. Melting peaks were calculated by the instrument.

Sensitivity, specificity and detection limit of the qPCRgyrALp

The sensitivity and specificity of the qPCRgyrALp assay were determined by testing the *Legionella* sp. and non-*Legionella* strains listed in tables S1 and S2. The assay specifically detected the *gyrA* QRDR of *L. pneumophila*. Only a weak amplification signal was obtained with some of the other *Legionella* species when very high bacterial load were tested, but the obtained melting curves were bimodal and could be easily differentiated from those obtained with *L. pneumophila* strains (data not shown). The analytical sensitivity of the assay was determined by testing serial dilutions of a titrated *L. pneumophila* Paris DNA suspension. The detection limit, as defined by the lowest number of genome units (GU) of *L. pneumophila* which gave a positive amplification in at least 9/10 tests, was 9.3 GU per test (5µL of DNA extract). Then, we tested the ability of the qPCRgyrALp to differentiate wild-type from mutated *gyrA* QRDR alleles. We tested four *L. pneumophila* reference strains and three fluoroquinolones-resistant mutant strains previously obtained in our laboratory from *L. pneumophila* Paris strain (8). The mean +/- SD melting peaks were 59,11 +/- 0.26 °C, 64.08 +/- 0.32°C, 64.47 +/- 0.28 °C and 62.46 +/- 0.35 °C for the reference strains Paris (n=7), Philadelphia (n=3), Lens (n=3) and Lorraine (n=3), respectively. They were 56.9 +/- 0.48 °C for the *gyrA83* (T83I) mutant (n=10), 50.98 +/- 0.3 °C for the *gyrA83* plus *gyrA87* (D87N) mutant (n=3), and 49.8 +/- 0.28 °C for the *gyrA83* plus *gyrA87** (D87H) mutant (n=3). Thus, the qPCRgyrALp assay could differentiate strains harbouring a wild-type *gyrA* QRDR

(melting temperature ≥ 59°C) from those with a mutated *gyrA* QRDR allele (Figure S1), but also single from double *gyrA* mutants (Figure S2).

The qPCRgyrALp assay was then applied to 139 respiratory samples collected from the 82 legionellosis patients for *in vivo* detection of fluoroquinolones-resistant mutants of *L. pneumophila* (Figure 1). A *L. pneumophila gyrA* QRDR could be amplified from 108/113 (95.6%) respiratory samples with a positive qPCRmip assay, but only 7/26 (26.9%, $p<0.01$) samples with a negative qPCRmip assay, suggesting DNA load in clinical samples was critical for detection of either of these two gene targets. The 115 respiratory samples with a positive qPCRgyrALp test were collected from 55 patients, including 9 patients with no fluoroquinolone therapy (11 samples), 33 patients under fluoroquinolone therapy (64 samples), and 13 patients with unknown treatment status (40 samples).

***Legionella gyrA* QRDR amplification and sequencing**

For positive qPCRgyrALp assays, we confirmed the presence of *gyrA* QRDR mutations by PCR amplification and sequencing of this DNA region (using primers LgyrALubS7 and LgyrALubASR2bis) from the corresponding sample. DNA sequencing was performed using the same primers and the GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Roissy, France) and a CEQ2000 Dye Terminator cycle sequencing protocol (Beckman Coulter). DNA sequences were analyzed using the CEQ2000XL apparatus (Beckman Coulter). They were compared to the *gyrA* QRDR sequence of wild-type *L. pneumophila* Paris using BLAST software (NCBI).

Next-generation sequencing of *Legionella gyrA* QRDR

High-throughput pyrosequencing technology was used to assess the presence of several *gyrA* QRDR alleles in each of 10 human respiratory samples, including seven qPCRgyrALp-positive samples from patients #1 to #4, and three qPCRgyrALp-negative samples from three control patients. We used a 454 GS Junior titanium platform and the sequencing protocol

recommended by the manufacturer (Roche diagnostics, Meylan, France). Briefly, the *gyrA* QRDR sequences contained in each clinical sample were first amplified using fusion primers LgyrALubS7 and LgyrALubASR2bis containing 454-specific adaptors and barcodes (multiplex identifiers or MIDs). The PCR mix contained for each sample, 0.4µl Phusion®Hot start 2 enzyme (Finnzyme, Illkirch, France), 4µl of Phusion® HF buffer, 0.4µl of 10mM dNTPs, 1µl of forward and reverse MID-tagged primers (10 µM), 12.2 µl of H_2O-free nuclease, and 2µl of DNA extract. The PCR amplification program included an initial denaturation at 98°C for 30 seconds; then 50 cycles of denaturation at 98°C for 5 seconds, annealing at 55°C for 15 sec and elongation at 72°c for 35 sec; and a final extension step at 72°C for 5 min. The amplified products were visualized on agarose gel 1% with GelRed (Biotium, Hayward, California), purified using AMPure beads (Beckman Coulter), and quantified using Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies, Vénissieux, France). The average molecular size of the amplicons was 473 bp. The preparation of the fragment library, the emulsion PCR and sequencing were performed according to the manufacturer's recommendations (http://454.com/my454/index.asp). We obtained 2089 to 17060 reads for each DNA sequence. We used the GS Mapper software (Roche Diagnostics) to determine parallel genetic variations at *gyrA* codon positions associated with fluoroquinolones resistance.

TABLES

Table S1. ***Legionella pneumophila*** **strains used in the present study**

L. pneumophila **Strain**	**Source**	**Ciprofloxacin MIC (mg/L)**	***gyrA*** **QRDR (GyrA substitution)**
Paris	CIP 107629T	0.38	Wild-type (none)
Philadelphia	ATCC 33152	0.38	Wild-type (none)
Lens	CIP 108286	0.38	Wild-type (none)
Lorraine	CIP 108729	0.38	Wild-type (none)
Paris	LPPI1 mutant	1.5	C248T (T83I)
Paris	LPPI4 mutant	1.5	C248T+G259A (T83I+D87N)
Paris	LPPI5 mutant	1.5	C248T+G259C (T83I+D87H)

Table S2. Other *Legionella* species used in the present study

Strain	Origin	Strain	Origin
*L. anisa**	ATCC 35849	*L. jordanis**	ATCC 33624
L. birmingham	ATCC 700709	*L. jordanis**	ATCC 700762
L. birmingham	ATCC 73702	*L. lansingensis**	ATCC 49751
*L. bozemanii**	ATCC 33217	*L. longbeachea**	ATCC 33462
*L. bozemanii**	ATCC 35545	*L. longbeachea**	ATCC 33485
L. donaldsonii	ATCC LC878	*L. maceachernii**	ATCC 35300
*L. drancourtii**	ATCC 50991	*L. micdadei**	ATCC 33218
*L. dumoffi**	ATCC 35280	*L. oakridgensis*	ATCC 33761
L. feeleii sg1	ATCC 35072	*L. oakridgensis*	ATCC 700515
L. feeleii sg2	ATCC 35849	*L. parisiensis* *	ATCC 700174
L. feeleii	ATCC 700514	*L. parisiensis* *	ATCC 35299
L. hackelia	ATCC E135250	*L. tucsonensis**	ATCC 49180
L. hackelia	ATCC E2 35999	*L. wadsworthii*	ATCC 33877
*L. gormanii**	ATCC 33297		

* *Legionella* strains for which the *gyrA* QRDR sequence was determined in the present study

Table S3. Non-*Legionella* strains used in the present study

Strain	Origin	Strain	Origin
Bacillus sp.	clinical isolate	*Staphylococcus aureus*	ATCC 6538
Corynebacterium striatum	clinical isolate	*Staphylococcus epidermidis*	ATCC 12228
Enterobacter casseliflavus	clinical isolate	*Staphylococcus saprophyticus*	clinical isolate
Enterococcus faecium	clinical isolate	*Staphylococcus sciuri*	clinical isolate
Enterococcus hirae	clinical isolate	*Streptococcus agalactiae*	clinical isolate
Escherichia coli	clinical isolate	*Streptococcus anginosus*	clinical isolate
Haemophilus influenzae	clinical isolate	*Streptococcus gordonii*	clinical isolate
Haemophilus parainfluenzae	clinical isolate	*Streptococcus haemolyticus*	clinical isolate
Klebsiella oxytoca	ATCC 43863	*Streptococcus mitis*	clinical isolate 1
Kocuria kristinae	clinical isolate	*Streptococcus mitis*	clinical isolate 2
Micrococcus luteus	clinical isolate	*Streptococcus mutans*	clinical isolate
Propionibacterium acnes	clinical isolate	*Streptococcus equi*	clinical isolate
Proteus mirabilis	clinical isolate	*Streptococcus oralis*	clinical isolate
Pseudomonas aeruginosa	clinical isolate	*Streptococcus pneumoniae*	ATCC 49619
Serratia marcescens	clinical isolate	*Streptococcus pneumoniae*	ATCC 6303
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	*Streptococcus salivarius*	clinical isolate
Staphylococcus aureus	ATCC 9144		

Figure S1. Melting curves obtained with the qPCRgyrALp test for wild-type strains of *L. pneumophila.*

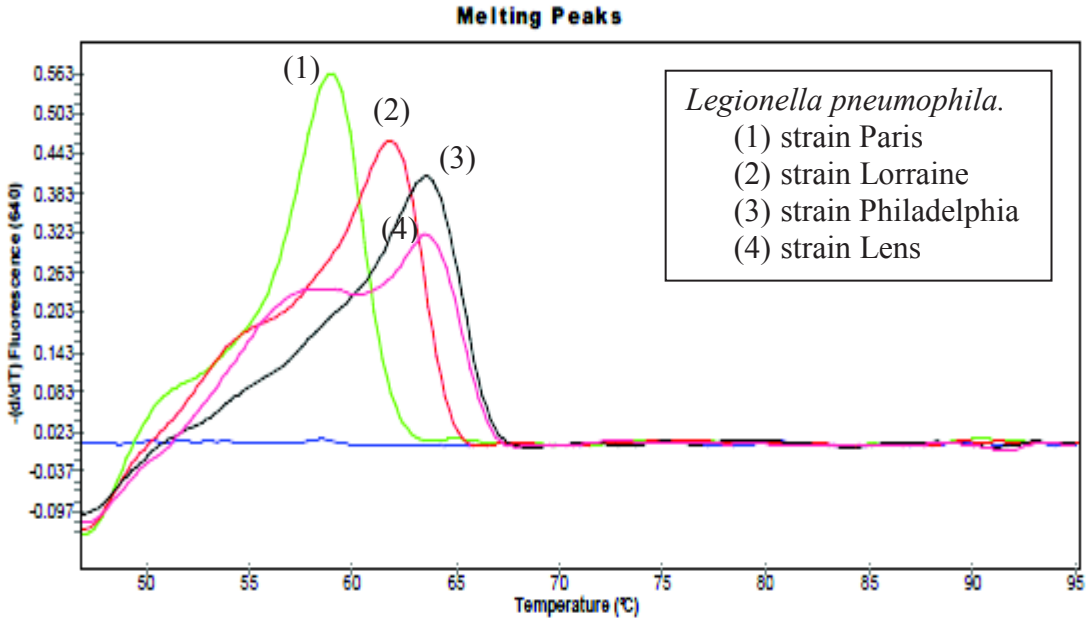
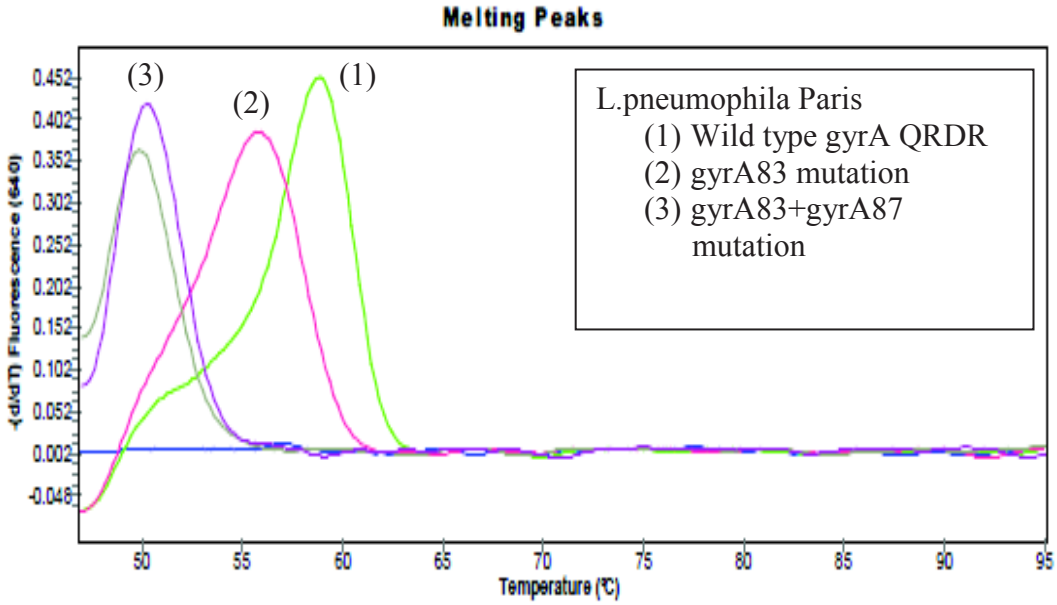


Figure S2. Melting curves obtained with the qPCRgyrALp test for the wild-type *L. pneumophila* Paris strain and two derived mutant strains with a single or two *gyrA* mutations.



Travail personnel n° 2

Cette partie de la thèse présente des résultats complémentaires obtenus lors du travail précédent. Elle concerne d'une part les résultats de séquençage du gène *gyrA* chez l'ensemble des souches de *Legionella* étudiées et leur intérêt potentiel comme outil d'identification et/ou de typage moléculaire de ces bactéries. D'autre part, nous présentons les résultats obtenus lors de la recherche de mutants *gyrA* au sein d'une collection de souches environnementales de *Legionella* sp. Nous avons souhaité présenté ces résultats sous la forme de deux articles courts.

Recherche de mutants *gyrA83* par qPCRgyrALp dans une collection d'isolats environnementaux de *Legionella pneumophila*

INTRODUCTION :

L'utilisation large des antibiotiques a entrainé une sélection de résistances à ces molécules chez la plupart des espèces bactériennes qui colonisent l'Homme et les animaux (G. Jacoby 2005, Pasculle et al 1980). Ces bactéries, les gènes de résistance aux antibiotiques qu'elles portent et les molécules antibiotiques sont par ailleurs libérés dans l'environnement (Zhang, Zhan et H.H.P 2009, Baquero, Martinez et Canton 2008). Un large éventail de gènes de résistance aux antibiotiques peut maintenant être détecté par des techniques de métagénomique dans la plupart des environnements aquatiques et telluriques (Martínez 2008, O'Brien 2002). Les *Legionella* ont comme réservoir principal l'environnement aquatique (Declerck 2010). De ce fait, ces bactéries sont potentiellement en contact avec des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, avec les déterminants génétiques codant ces résistances, et avec les concentrations résiduelles des antibiotiques dans l'environnement. Elles sont donc

susceptibles elles-mêmes de développer des résistances, soit par mutations soit par acquisition d'ADN exogène. Bien que les fluoroquinolones soient des antibiotiques synthétiques, des concentrations résiduelles de ces antibiotiques sont maintenant détectées dans de nombreux environnements (Sukul et Spiteller 2007). Plusieurs études ont recommandé une surveillance active de la sélection de résistance aux antibiotiques chez les bactéries de l'environnement (Zhang, Zhan et H.H.P 2009, Baquero, Martinez et Canton 2008).

Dans cette deuxième étude, nous avons utilisé le test de qPCRgyrALp précédemment développé pour tenter de détecter dans l'environnement des souches mutantes de *L. pneumophila* résistantes aux fluoroquinolones par substitution d'acide aminé au niveau des codons 83 et/ou 87 dans la région QRDR du gène *gyrA*. Nous avons testé cet outil sur des isolats environnementaux isolés du réseau d'eau du CHU de Grenoble et de différents systèmes d'adduction d'eau en Isère.

MATERIEL ET METHODES

Souches bactériennes

Nous avons utilisé 4 souches *L. pneumophia sg1* de référence : *Paris (CIP 107629T), Philadelphia (ATCC 33152), Lens (CIP 108286) et Lorraine (CIP 108729*).

Nous avons collecté 12 isolats bactériens de *L. pneumophila* obtenus à partir du réseau d'eau du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble sur une période de 2ans entre 2011-2012. Il s'agissait de 4 souches de *L. pneumophila sg1* et 8 souches de *L. pneumophila sg2-14*. Nous avons testé également 48 souches de *L. pneumophhila sg1* analysées au Laboratoire des eaux (don de Mme Perrine Chevallier, Directeur de laboratoire régional d'analyses des eaux, Montbonnot Saint-Martin) et provenant de divers réseaux d'adduction d'eau en Isère. Ces isolats ont été collectés sur une période de 2 ans, entre 2010 et 2012. Ces 60 souches ont été mises en culture en milieu BCYE, incubés à 37°C.

Etude de la sensibilité aux antibiotiques par E-test

Les CMI de plusieurs antibiotiques vis-à-vis de ces souches de *L. pneumophila* ont été déterminées en utilisant la méthode du E-test (bioMérieux). Un inoculum bactérien de 1 McFarland a été préparé en milieu cœur-cervelle (bouillon BHI, bioMérieux), et étalé en géloses BCYE. Pour chaque antibiotique, la bande E-test a été appliquée sur la gélose après absorption de l'inoculum, et cette gélose a été incubée à 35 ± 2 ° C, en atmosphère enrichie avec 5% de CO2, pendant 3-5 jours. La lecture de la CMI a été réalisée directement sur la bandelette, à l'intersection du bord de la zone d'inhibition.

Test de qPCRgyrALp

Pour les cultures de bactéries, un inoculum bactérien de 0,5 McFarland a été préparé dans un tampon phosphate. L'extraction et la purification de l'ADN ont été effectuées en utilisant le kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les recommandations du fabricant.

Les amorces choisies pour le test qPCRgyrALP étaient LpgyrALSFw (5'-CCTGATGTACGTGATGGTTTAA-3') et LpgyrALSRv (5'-GCATGGCAGCTGGAGCATCTCC-3'). Elles ont permis d'amplifier un fragment de 259 pb du gène *gyrA*. La sonde LPgyrALSP1 (5'-GGGGATACAGCTGTTTATGACAC-Fluo-3') a permis la détection de modifications au niveau des nucleotides 241 à 263 codant pour les acides aminés 81 à 88. La sonde d'ancrage LpgyrALSP3 (5'-LCRed640-TTGTTCGTATGGCTCAGCCTTTTTC-P-3') a été conçue de façon à obtenir une hybridation optimale avec toutes les souches de *L. pneumophila* malgré une variabilité inter-souche au niveau de cette région.

Pour chaque test , un mélange réactionnel de 20 ul de PCR a été préparée en ajoutant 2 ul de mélange de réaction Light Cycler® Fast StartDNA Master Hybprobe (Roche Diagnostics

GmbH, Mannheim, Germany), 3 ul de MgCl2 à 25mMol / L , 1 µL de chaque amorce suspension à 10 pMol/µL, 1 µL de la sonde de détection à 4 pMol/µL, 2 ul de la sonde d'ancrage à 4 pmol / uL, 0,5 ul de l'uracile - ADN glycosylase (UDG , 0,5 U) , 5 µL d' ADN matrice , et 4,5 µL d'eau PCR grade . Le programme de PCR comprenait les étapes suivantes : dénaturation initiale à 94 ° C pendant 2 min ; 45 cycles de dénaturation à 95 ° C pendant 10 s, hybridation à 55 ° C pendant 10 sec et extension à 72 ° C pendant 15 s ; et une étape d'extension finale à 72 ° C pendant 1 min. Ensuite, les courbes de fusion ont été construites en abaissant la température à 47 ° C, et en élevant la température de 0,1 ° C / sec à 95 ° C tout en mesurant en continu l'intensité de fluorescence.

Séquençage de *gyrA* par technique de Sanger

Nous avons confirmé la présence de mutations *gyrA* par amplification et séquençage d'une portion de ce gène à partir des extraits ADN préparés précédemment. Nous avons utilisé les amorces LgyrALubS7 (5'-GCGATGAGTGTCATTGTAG-3') et LgyrALubASR2bis (5'-GTTTCATCATAGTTAGGGCTAAAATCAAC-3'). Le séquençage de l'ADN a été effectué en utilisant le kit GenomeLab DTC - Quick Start (Beckman Coulter, Roissy, France) et un protocole de séquençage de type CEQ2000 Dye Terminator (Beckman Coulter). Les séquences d'ADN ont été analysées en utilisant l'appareil CEQ2000XL (Beckman Coulter).

Séquençage de *gyrA* par technique de pyrosequençage

Cette technique a été utilisée pour évaluer la présence de plusieurs allèles *gyrA* QRDR dans un isolat environnemental. Nous avons utilisé une plate-forme GS junior 454 et le protocole de séquençage recommandé par le fabricant (Roche Diagnostics, Meylan, France) les les séquences *gyrA* ont d'abord été amplifiées en utilisant des amorces fusion LgyrALubS7 et LgyrALubASR2bis contenant les adaptateurs 454 spécifiques et un identifiant multiplex ou

MID. (protocol décrite en Article 1), la PCR en émulsion et le séquençage ont été réalisés selon les recommandations du fabricant (http://454.com/my454/index.asp). Nous avons utilisé le logiciel GS Mapper (Roche Diagnostics) pour déterminer les variations génétiques parallèles aux positions des codons gyrA associées à la résistance aux fluoroquinolones.

RESULTATS

Sensibilité aux fluoroquinolones

L'étude de la sensibilité aux fluoroquinolones par la méthode du E-test a montré que l'ensemble des 60 souches testées sont sensibles à la ciprofloxacine et à la rifampicine, avec des valeurs de CMI respectivement de 0.25-0.38 mg/L et 0.016 mg/L. Les mêmes CMI ont été trouvées pour les souches de référence.

Tests qPCRgyrALp

Le test de qPCRgyrALp appliqué aux 60 souches a montré un profil de type sauvage (absence de mutation au niveau du QRDR de *gyrA*) pour 50 souches. Au contraire, pour 6 isolats de *L. pneumophila* du CHU de Grenoble (1 souche de *L. pneumophila* sg1 et 5 souches de *L. pneumophila* sg2-14) et 4 souches d'Isère collectées hors du CHU nous avons obtenu un profil de courbe de fusion compatible avec la présence d'une mutation *gyrA83*.

Tableau 2 : Isolats environnementaux de *Legionella pneumophila* donnant un profil suspect.

Isolat	date	Ville	Lieu	site de prélèvement
1	08/03/2011	Fontaine	184	sdis fontaine
2	17/01/2011	Echirolles	hôpital sud	office 634 niveau 6 (lavabo)
3	11/01/2011	Bourg d'oisans	rés. abel maurice pôle a	chambre 22 – lavabo
4	24/12/2010	Seyssinet	gymnase louis carrel	douche vestiaire n° 1

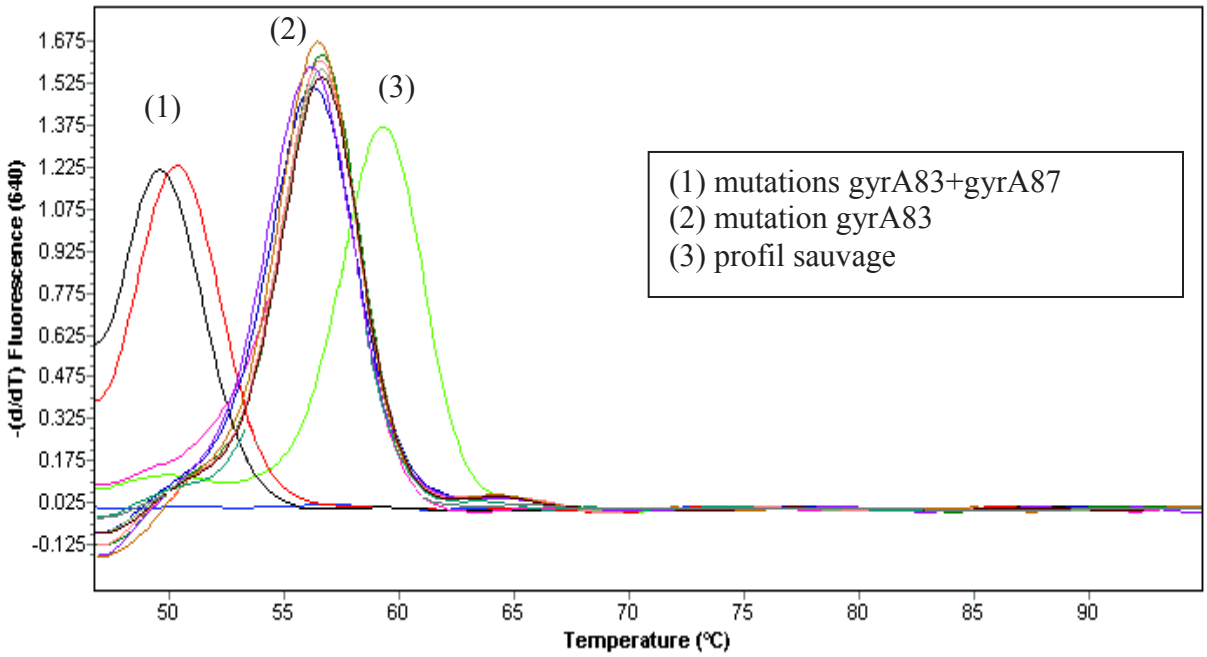


Figure 2 : Isolats du CHU de Grenoble montrant un profil de type mutant *gyrA83* pour 6 isolats (2).

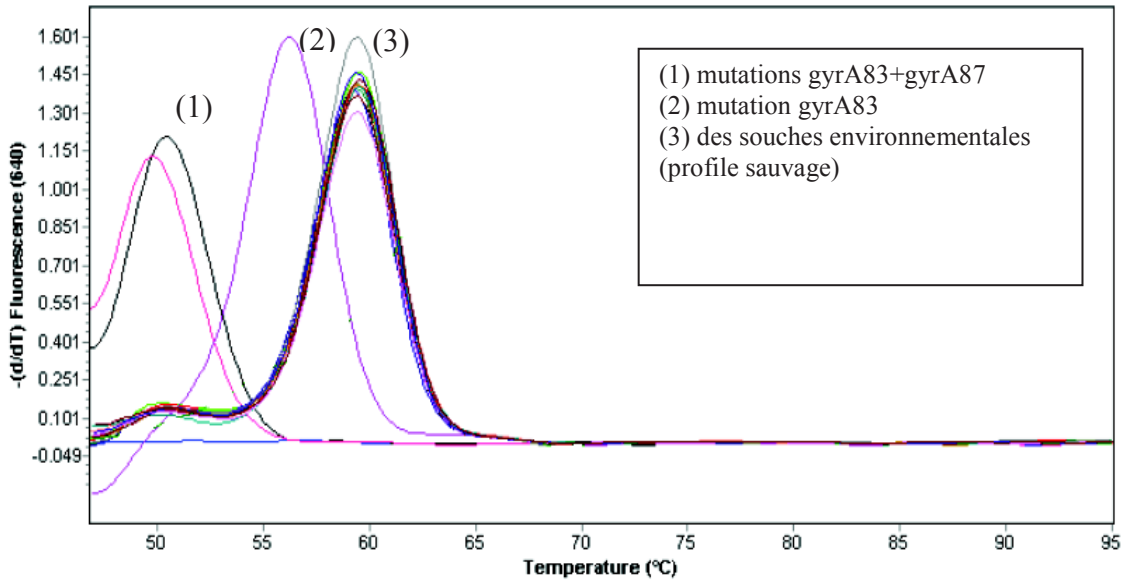


Figure 3: Test qPCRgyrALp appliqué aux isolats environnementaux du laboratoire des eaux, montrant un profil de souche sauvage pour la plupart des isolats (3).

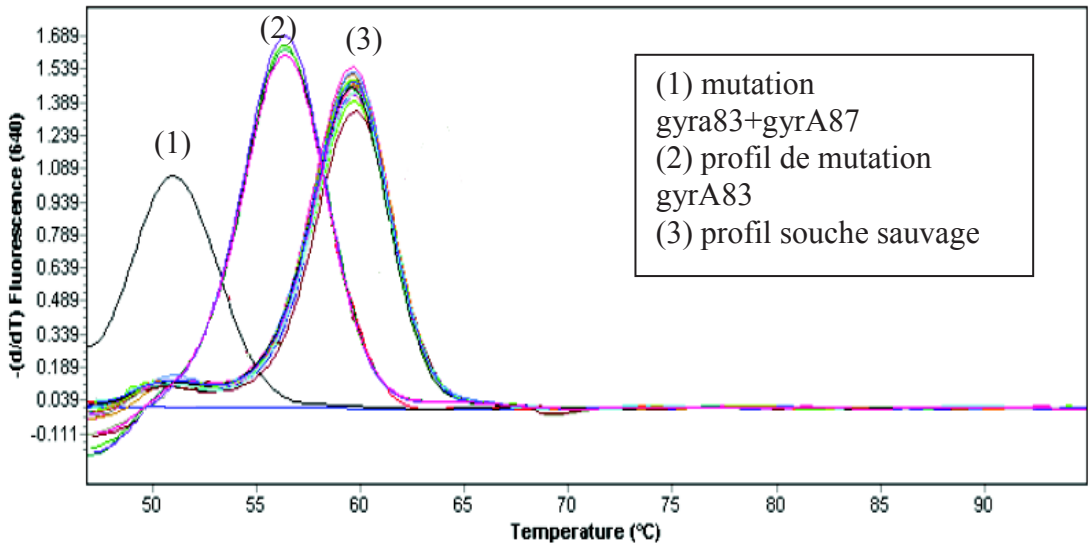


Figure 4 : Cette figure montre quatre souches parmi les isolats environnementaux du laboratoire des eaux avec un profil compatible avec un profil évoquant une mutation gyrA 83 (2).

Séquençage de *gyrA* et résistance aux fluoroquinolones

Afin de vérifier l'existence de cette mutation *gyrA83* dans les dix souches suspectes, nous avons séquencé un fragment de 383 pb de la région QRDR de ce gène en utilisant les amorces LgyrALubS7 (5'-GCGATGAGTGTCATTGTAG-3'), et LgyrALubASR2bis (5'-GTTTCATCATAGTTAGGGCTAAAATCAAC-3'), et mêmes conditions de séquençage utilisées dans l'article1.

L'alignement des séquences montre deux profils différents de *Legionella pneumophila.*

Figure 5 : Alignement des souches de référence et des souches environnementales, avec les mutants *L.pneumophila Paris* reconstruits et les prélèvements des patients pour lesquels le test qPCRgyrALp a détecté la mutation *gyrA83*.

Vert : mutations *gyrA83/87* chez les mutants reconstruits et les mutants détectés in vivo dans les prélèvements cliniques.
Bleu : modifications détectées chez les *Legionella* non *L. pneumophila* au niveau de la sonde de détection du test qPCRgyrALp.
Rouge : mésappariements de toutes les souches de *L. pneumophila* et non pneumophila par rapport à la sonde d'ancrage SP3.
Violet : modifications au niveau des deux bases situées entre les sondes, par rapport à la souche de référence *L. pneumophila Paris*
gris : deux mésappariements au niveau de la sonde d'ancrage causant un profil différent des souches *L. pneumophila* sauvages, et de ce fait un faux positif.

La technique du séquençage à haut débit a été réalisée pour une seule souche de l'environnement, mais aucune mutation du QRDR de *gyrA* n'a été détectée sur un nombre de lectures de 14712.

DISCUSSION

Le test qPCRgyrALp développé précédemment (article 1) a été utilisé pour analyser une collection de souches environnementales de *L. pneumophila* dans le but de détecter des mutants résistants aux fluoroquinolones. Aucun mutant *gyrA83* et/ou *gyrA87* n'a été trouvé dans cette étude. Par contre nous avons détecté des faux positifs, c'est-à-dire des profils de courbes de fusion suggérant une mutation *gyrA83* mais sans confirmation de cette mutation après séquençage du gène *gyrA*. Ces faux positifs se sont avérés être liés à une variabilité au niveau de la région nucléotidique du gène *gyrA* ciblée par la sonde d'ancrage que nous avions définie pour le test qPCRgyrALp. En effet, cette sonde d'ancrage a été définie après alignement des gènes *gyrA* de toutes les souches disponibles de *L. pneumophila*. Malgré une optimisation de cette étape, nous avons été obligés de définir cette sonde d'ancrage dans une zone nucléotidique présentant une certaine variabilité entre différentes souches de *L. pneumophila*. L'étude des souches environnementales de *L. pneumophila* a montré que cette variabilité était encore plus importante que celle observée initialement. Une diminution artéfactuelle de la température de fusion, pouvant évoquer une mutation *gyrA83*, a été observée pour des souches présentant au moins 3 mésappariements au niveau de la sonde d'ancrage. Bien que cette situation ait été rarement observée, elle impose de modifier notre stratégie de détection des mutants *gyrA* chez *L. pneumophila* afin d'améliorer la spécificité de notre test. Une autre limite du test actuel est le risque théorique d'amplifier une des nombreuses espèces de *Legionella* autre que *L. pneumophila*, largement répandues dans divers environnements aquatiques.

Le test de séquençage haut débit a été utilisé pour détecter d'éventuels alléles génetiques au niveau de la région QRDR du gène *gyrA* dans une colonie de *L. pneumophila* apparemment sensible aux fluoroquinolones. Pour certaines entérobactéries comme *Escherichia coli* par exemple, le taux de mutations spontanées responsable de la résistance aux fluoroquinolones est de l'ordre de 10^{-6}. Ces mutants peuvent donc apparaitre au sein d'une colonie bactérienne

pour laquelle le nombre de bactéries varie de 10^6 à10^9 en fonction de la durée d'incubation des cultures. Dans le cas de *L. pneumophila* nous n'avons pas détecté de mutants (*gyrA83* notamment) à partir de la colonie étudiée.

Intérêt du séquençage du gène *gyrA* comme outil d'identification et de typage des *Legionella*

Les critères phénotypiques d'identification conventionnelle des bactéries ont été utilisés pour l'identification des bactéries du genre *Legionella* : aspect macroscopique des colonies à la loupe binoculaire, absence de la croissance sur des milieux dépourvus de facteurs de croissance comme la L-cystéine, pigmentation rouge ou autofluorescence bleue sous lumière ultraviolette de longueur d'onde 365nm des colonies, etc. Cette méthode n'est pas suffisante pour identifier et différencier l'ensemble des espèces du genre *Legionella*.

Les méthodes immunologiques ne permettent la discrimination que de 15 sérogroupes pour l'espèce *Legionella pneumophila* et encore moins de sérogroupes pour les autres espèces de ce genre. Il existe d'autre part des réactions sérologiques croisées qui limitent l'intérêt de ces techniques comme outil d'identification.

Les méthodes de typage sont essentielles sur le plan épidémiologique, notamment pour les cas nosocomiaux ou communautaires épidémiques de légionellose. Ces méthodes d'identification moléculaire sont basées sur deux principes : 1/ la comparaison des profils de migration de fragments d'ADN avec ou sans amplification préalable (PFGE, RADP, MELVA, etc.). 2/ la comparaison des séquences nucléotidiques de portions de gènes ou de séquences intergéniques (SBT, MLST, etc.).

Récemment, Underwood et al (2013) ont montré que la technique de SBT est une bonne alternative au séquençage du génome complet de *L. pneumophila*, cette technique étant également nettement moins couteuse que le séquençage haut débit. Kozak-Muiznieks et al (2014) ont utilisé la technique de SBT pour détecter les génotypes qui ont une grande prévalence parmi les isolats cliniques et environnementaux de *L. pneumophila* aux Etats Unis. Le ST (sequence type) le plus fréquent à la fois en pathologie humaine et dans l'environnement était le ST1. Les STs de *L. pneumophila* sg1 responsables à la fois de cas

épidémiques et sporadiques de légionellose étaient les suivants : ST1, ST35, ST36, ST37 et ST222.

Dans ce travail, nous avons montré que la comparaison des séquences ADN correspondant à un fragment de 383-bp de la région QRDR du gène *gyrA* permet de différencier les espèces du genre *Legionella*.

MATERIEL ET METHODES

Souches bactériennes

Nous avons utilisé 4 souches de référence de *Legionella pneumophila* : *Paris (CIP 107629T), Philadelphia (ATCC 33152), Lens (CIP 108286),* et *Lorraine (CIP 108729).* Nous avons également étudié 26 souches de référence appartenant à 17 espèces différentes du genre *Legionella.* Ces souches provenaient du Centre National de Référence des *Legionella* (Dr. S. Jarraud, Pr. J. Etienne, Lyon), hormis la souche *Legionella drancourtii* qui provenait de l'unité URMITE (Pr. B. La Scola, Marseille).

Toutes ces souches avaient été préalablement identifiées par des méthodes phénotypiques et moléculaires au CNR des *Legionella* ou à l'URMITE.

Séquençage du QRDR de *gyrA*

Le séquençage d'une portion de 383 pb du gène *gyrA* a été obtenu en utilisant les amorces LgyrALubASR2bis (5'-GTTTCATCATAGTTAGGGCTAAAATCAAC-3') et LgyrALubS7 (5'-GCGATGAGTGTCATTGTAG-3').

Le protocole d'amplification utilisait le mélange réactionnel suivant: 2 µl de suspension de chaque amorce de 10 pmol/µl LgyrALubS7 et LgyrALubASR2bis ; 25 µl de Pwomaster® (Roche diagnostics, Meylan, France); 5 µl d'extrait d'DNA; et 16 µl de l'eau (PCR-grade).

Le programme d'amplification était le suivant : une denaturation initiale de 2 min à 94°C; puis 35 cycles de 30 sec de denaturation à 94°C, hybridation à 55°C pendant 30 sec, élongation à 72°C pendant 1 min.

Pour toutes les souches de références étudiées, nous avons séquencé un fragment de 383 pb

de gène *gyrA* en utilisant les amorces LgyrALubASR2bis (5'-GTTTCATCATA GTTAGGGCTAAAATCAAC-3'), et LgyrALubS7 (5'-GCGATGAG TGTCATTGTAG-3'), le GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Roissy, France) et le protocole CEQ2000 Dye Terminator cycle sequencing protocol (Beckman Coulter). L'appareil CEQ2000XL (Beckman Coulter) a été utilisé pour réaliser ce séquençage ADN, et les séquences obtenues ont été comparées à l'aide du logiciel BLAST(NCBI) par comparaison à la souche sauvage *L. pneumophila* Paris.

RESULTATS

Nous avons pu obtenir une séquence *gyrA* chez les quatre souches de référence de *Legionella pneumophila*, 15 souches de *Legionella* appartenant à 11 espèces autres que *L. pneumophila*, et la souche *L. drancourtii.* L'alignement de ces séquences a permis de monter un profil du fragment QRDR de gène *gyrA* étudié spécifique de chaque espèce de *Legionella* (Figure 1).

La figure 1 montre l'alignement d'un fragment de 76 bases du gène *gyrA*. On note aisément sur cette figure le niveau de diversité de la séquence nucléotidique de ce gène chez différentes souches de *L. pneumophila*. Cette diversité est encore plus importante pour les souches appartenant aux autres espèces de *Legionella.* En fait, la séquence ADN du gène *gyrA* permet de différencier l'ensemble des espèces du genre *Legionella*. Cette diversité peut compliquer toute tentative de développer un outil moléculaire permettant la détection du gène *gyrA* chez toutes les espèces de *Legionella*, mais au contraire peut permettre de développer des outils spécifiques d'identification de chacune de ces espèces.

DISCUSSION

Le séquençage d'un fragment du gène *gyrA* a été utilisé pour la discrimination au niveau de l'espèce des bactéries du genre *Campylobacter* (Husman, et al. 1997) ou du genre *Mycobacterium* (Guillemin, Cambau et Jarlier 1995). Concernant le genre *Legionella*, une étude portant sur l'utilité de séquencer le gène *gyrA* à des fins épidémiologiques a été réalisée

en 2000 (Feddersen, et al. 2000). Cette méthode de typage semble très intéressante pour l'identification des différentes espèces du genre *Legionella*, en particulier directement à partir des prélèvements cliniques ou environnementaux en cas d'échec d'isolement en culture de la souche de *Legionella* correspondante. Notre étude portant sur un fragment de 383 pb de gène *gyrA* montre qu'un fragment court de ce gène a une bonne capacité de discrimination des espèces du genre *Legionella*, mais aussi différentes souches au sein de l'espèce *L. pneumophila*. Le gène *gyrA* pourrait sans doute être ajouté à la liste des gènes cibles utilisés actuellement pour le typage génétique des souches de *L. pneumophila* par la méthode de SBT (sequence based typing) préconisée par l'EWGLI. Il permet en parallèle de rechercher des mutations *gyrA* liées à la résistance aux fluoroquinolones. Cette étude devra cependant être élargie à l'ensemble des espèces caractérisées du genre *Legionella* de façon à confirmer définitivement l'intérêt du gène *gyrA* comme marqueur d'identification et de typage de ces bactéries.

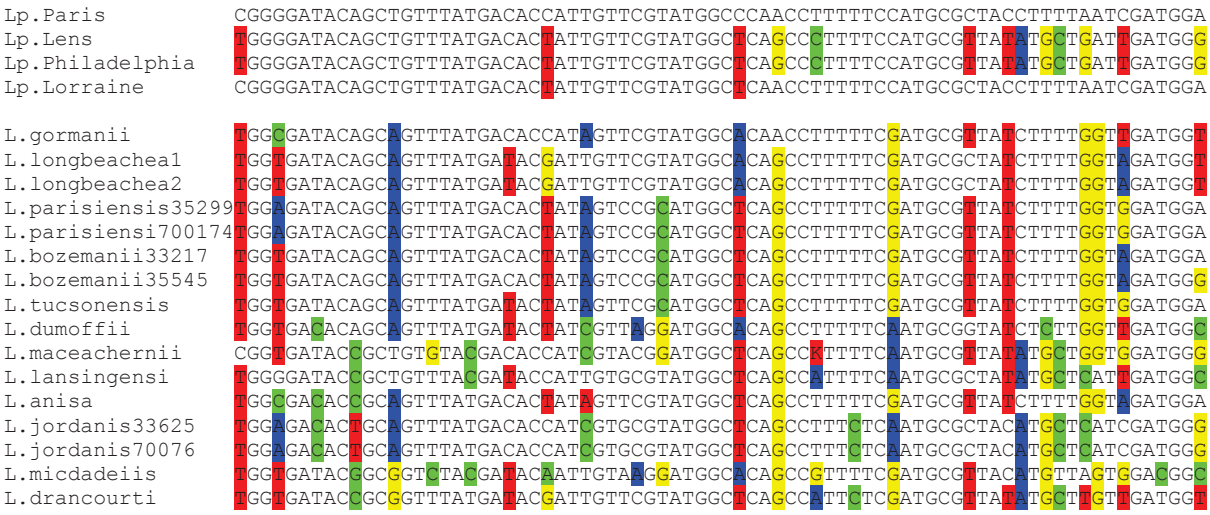


Figure 1 : alignement d'un fragment de 76pb du QRDR du gène *gyrA* montrant une grande diversité de cette région entre différentes espèces de *L. pneumophila* par rapport à *L. pneumophila* souche Paris prise comme séquence *gyrA* de référence.

Les couleurs servent à montrer les différences par rapport à *L.pneumophila Paris*. A : bleu, T : rouge, C : vert, G : jaune.

Tableau 1 : souches de *Legionella* étudiées.

Strain	Origin	Strain	Origin
*L. anis**	ATCC 35849	*L. jordanis**	ATCC 33624
L. birmingham	ATCC 700709	*L. jordanis**	ATCC 700762
L. birmingham	ATCC 73702	*L. lansingensis**	ATCC 49751
*L. bozemanii**	ATCC 33217	*L. longbeachea**	ATCC 33462
*L. bozemanii**	ATCC 35545	*L. longbeachea**	ATCC 33485
L. donaldsonii	ATCC LC878	*L. maceachernii**	ATCC 35300
*L. dumoffi**	ATCC 35280	*L. micdadei**	ATCC 33218
L. feeleii sg1	ATCC 35072	*L. oakridgensis*	ATCC 33761
L. feeleii sg2	ATCC 35849	*L. oakridgensis*	ATCC 700515
L. feeleii	ATCC 700514	*L. parisiensis* *	ATCC 700174
L. hackelia	ATCC E135250	*L. parisiensis* *	ATCC 35299
L. hackelia	ATCC E2 35999	*L. tucsonensis**	ATCC 49180
*L. gormanii**	ATCC 33297	*L. wadsworthii*	ATCC 33877
*L.drancourtii**	ATCC 50991		

* : **souches pour lesquelles nous avons déterminé la séquence nucléotidique de 386 pb du géne *gyrA*.**

Travail personnel n° 3

INTRODUCTION

Le diagnostic de la légionellose peut être suspecté devant toute pneumonie, en particulier en cas de forme grave et/ou d'absence de réponse au traitement antibiotique par une beta-lactamine. Le diagnostic bactériologique repose sur 4 méthodes : la culture des *Legionella*, la détection de l'antigène urinaire de *L. pneumophila* de sg 1, les tests sérologiques, et les tests moléculaires. La culture représente la méthode de référence avec une spécificité de 100%, mais sa sensibilité est faible. La recherche des antigènes urinaires a amélioré depuis 2009 la sensibilité et la rapidité du diagnostic de légionellose, mais ce test est limité principalement à *L. pneumophila sg1*. Les méthodes sérologiques ne permettent qu'un diagnostic tardif en cas d'augmentation significative des titres anticorps spécifiques, mais demeure utile pour les espèces autres que *L. pneumophila*.

Actuellement, la positivité des tests de PCR spécifiques est considérée comme critère de cas probable de légionellose selon la définition européenne (www.ewgli.org). Les techniques d'amplification génique permettent cependant de poser un diagnostic rapide de légionellose quelle que soit l'espèce de *Legionella* en cause. Les gènes cibles sont habituellement ceux codant les ARN ribosomaux 5S et 16S, ou la séquence intergénique 23S-5S pour la détection de l'ensemble des espèces du genre *Legionella*, et le gène *mip* codant pour une protéine impliquée dans la virulence (*macrophage infectivity potentiator*) pour l'espèce *L. pneumophila*. Il existe également une PCR ciblant spécifiquement le sg 1 de *L. pneumophila* (Mérault, et al. 2011).

La technique de PCR en temps réel possède plusieurs avantages par rapport à la PCR classique tels qu'une grande rapidité de réalisation et un risque moindre de contamination par l'ADN exogène, du fait de l'absence d'étape post-PCR. La majorité des études publiées

montrent des spécificités proches de 100 %. La sensibilité varie en fonction du type d'échantillons analysé. Pour les prélèvements respiratoires, la sensibilité est généralement supérieure à celle de la culture, mais légèrement inférieure à celle de la méthode de détection de l'antigène urinaire pour *L. pneumophila* sg 1 (Koide *et al.*, 2006 ; Koide *et al.*, 2004). La concentration en *Legionella* semble significativement inférieure (>2 log inférieure) dans les lavages bronchoalvéolaires comparés aux crachats et aux aspirations bronchiques (Maurin et *al.* 2009).

Nous avons montré préalablement que la technique de PCR en temps réel permet de quantifier la charge bactérienne dans les expectorations des patients atteints de légionellose (Maurin, Hammer, et al. 2010), Nous avons montré également que la charge en *L. pneumophila* à l'admission des patients était corrélée à la sévérité clinique de la maladie, à la nécessité d'hospitaliser ces patients en réanimation et à une hospitalisation prolongée (Maurin, Hammer, et al. 2010). Dans le présent travail, nous avons souhaité conforter ces données sur une cohorte plus large de patients, et surtout évaluer l'intérêt du suivi de la charge bactérienne au cours de l'hospitalisation pour évaluer à la fois l'efficacité du traitement antibiotique et le pronostic final des patients

Kinetics of *L. pneumophila* load in respiratory samples as a prognosis and treatment efficacy marker in legionellosis patients.

Lubana Shadoud[1-3], Sophie Jarraud[4-7], Jerome Etienne[4-7], Carole Schwebel[1,9], Jean François Timsit[1,9,10], Max Maurin[1-3].

[1] Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

[2] CNRS UMR 5163, LAPM, Grenoble, France

[3] CHU de Grenoble, Institut de Biologie et de Pathologie, Grenoble, France

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

[5] CNRS UMR5308, Lyon, France

[6] Inserm U1111, Lyon, France.

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

[8] UVHCI, UMI 3265, UJF/EMBL/CNRS, Grenoble, France

[9] CHU de Grenoble, Réanimation Médicale, Grenoble, France

[10] INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

Short title: *L. pneumophila* burden and legionellosis prognosis.

Keywords: *Legionella pneumophila*, legionellosis, quantitative real-time PCR, prognosis

Corresponding author:

Pr. Max Maurin, Université Grenoble Alpes, CHU de Grenoble, Institut de Biologie et de Pathologie, 38043 Grenole, cedex 9, France. 33 4 76 76 95 94; mmaurin@chu-grenoble.fr

ABSTRACT

Legionnaire's disease is an acute and potentially severe pneumonia. In addition to the urinary antigen test, molecular methods have been recently developed for early diagnosis of this disease. Real-time PCR technology allows raid detection but also quantification of *Legionella* DNA in clinical samples of infected patients. Here we evaluated the usefulness of the *Legionella* DNA burden in respiratory samples and its evolution over time to predict the treatment efficacy and final prognosis in legionellosis patients. By studying a cohort of 116 legionellosis patients hospitalized to Grenoble University Hospital between 2003 and 2011, we demonstrated that the initial *Legionella* load correlated with severity of the diseases, and the kinetic of this marker in patients receiving appropriate antibiotic therapy correlated with the clinical evolution of these patients and their final outcome. Especially, we could distinguish patients responding favourably to the antibiotic treatment and who recover during the first week of hospitalization, from those necessitating prolonged hospitalization and who were significantly more at risk to death.

INTRODUCTION

Legionella species are the causative agents of legionellosis also called Legionnaires' disease, a severe pneumonia that occurs through inhalation of aerosols produced from water sources contaminated with these bacteria (Fields BS 2002). *L. pneumophila* serogoup (sg) 1 accounts for more than 90% of human infections worldwide (Newton, et al. 2010, Carratalà et Garcia-Vidal 2010). Isolation of a *Legionella* strain from clinical samples remains tedious and poorly sensitive (Murdoch 1996, Wilson, et al. 2003). On the other hand, significant antibody titres are usually detected only 2-3 weeks following symptoms onset (Zimmerman 1982). Diagnosis of legionellosis has been much improved by the widespread use of urinary antigen tests (UATs) for early detection of *L. pneumophila* serogroup 1 antigen in urines of infected patients (Woodhead, 2002). However, the mortality rates still vary from 10-15% (A. e. Mykietiuk 2005, Jespersen,

Sogaard, et al. 2010) in immunocompetent patients to 60% or more in immunocompromised ones (Stout et Yu, Legionellosis 1997). The prognosis mainly depends on the patient's previous health status (Diederen 2008) and rapidity of appropriate treatment administration (Lettinga, et al. 2002, Gacouin et al 2002).

More recently, PCR-based techniques have been developed for detection of *Legionella* sp. DNA in respiratory, serum and urine samples (Maurin, et al. 2010, Murdoch et al 1996, Matsiota-Bernard, Waser et Vrioni 2000). Several studies have shown that the sensitivity of PCR detection of *L. pneumophila* sg 1 in these clinical samples is lower than that of the UATs (Koide, et al. 2004). However, the PCR tests have the advantage of detecting all *Legionella* species and serogroups. They usually target the 16SrRNA encoding gene for detection of all *Legionella* species or the *mip* gene encoding a virulence factor (macrophage inhibition potentiator) for *L. Pneumophila* (Stolhaug et Bergh 2006, Maurin, et al. 2010). The real-time PCR technology currently provides faster and more reliable results without the need for post-PCR step, and also allows quantification of the *Legionella* bacterial load in respiratory samples (Maurin, et al. 2010). Using this technology, we previously demonstrated that a high *Legionella* load in respiratory samples at the time patients were admitted to hospital for legionellosis correlated with severe symptoms, the need for admission in an intensive care unit and prolonged hospitalization (Maurin, et al. 2010). The aim of the present study was to determine the kinetics of *L. pneumophila* bacterial load in respiratory specimens collected in ventilated ICU patients under antibiotic therapy to tentatively predict the clinical course and the final outcome in these patients.

MATERIAL AND METHODS

Patients

A first group of patients (group A) corresponded to 116 patients (91 men, 25 women, sex ratio 3.6) admitted to Grenoble University hospital for community-acquired legionellosis between 2003 and 2011 (Figure 3). The average age (+/- SD) and age range of these patients were 60+/- 13.4 years and 27-97 years, respectively. According to the European Working Group on *Legionella* Infections (EWGLI) criteria, all patients corresponded to confirmed cases of legionellosis because of clinical and radiological findings compatible with pneumonia and a positive urinary antigen test (UAT) for *L. pneumophila* sg1 (Binax Now *Legionella*, Binax, Portland, USA). Furthermore, isolation of a *L. pneumophila* sg 1 strain from a respiratory sample was obtained in 25 patients.

Among the 116 group A patients, a second group (group B) corresponded to 24 legionellosis patients (20 men, 4 women, sex ratio of 5) which could be investigated for *L. pneumophila* load kinetics in respiratory samples. The mean age +/- SD and age range of these patients were 52.7+/- 9.8 years and 28-78 years, respectively. Nineteen patients were admitted to the intensive care unit (ICU) because of severe pneumonia and the need for intubation and ventilation. Five patients were hospitalized outside the ICU because of a less severe form of the disease.

Clinical samples

We collected 191 respiratory samples from the 116 group A patients, including 119 sputum samples, 50 tracheal aspirates, 11 bronchial aspirates and 11 bronchoalveolar lavage fluids.

The 87 respiratory samples collected in group B patients included 26 sputum, 44 tracheal aspirates, 9 bronchial aspirates, and 8 bronchoalveolar lavage fluids These samples were collected at the time of hospital or ICU admission and then as part of routine care of these patients under specific antibiotic therapy. Samples were homogenised by incubation vol/vol with Digest-EUR ® (Eurobio, Courtaboeuf, France) at room temperature for 15 min. They

were then washed two times in PBS by centrifugation (2000 rpm for 5 min) and the supernatant was removed. The pellet was taken up in PBS (Phosphate buffer saline, Rosh Diagnostic) to obtain the same initial volume. DNA was extracted and purified from each sample using QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Legionella strains

L. pneumophila strain Paris (CIP 107629T) was used to prepare a positive control, and serial tenfold dilutions of a titrated DNA suspension for determination of calibration curves for real-time PCR quantification assays. Twenty five *L. pneumophila* sg1 strains were isolated from our cohort patients. We confirmed the susceptibility of eight stains to fluoroquinolones, rifampin, doxycycline, and azithromycin using the E-test method as previously described (Bruin, et al. 2012). We found respectively an MIC of 0.38 mg/L, 0.016 mg/L, 1.5-2 mg/L, and 0.38-0.47 mg/L for all these strains and the reference Paris strain of *L. pneumophila*.

L. pneumophila DNA load as determined by real-time PCR

The respiratory samples were tested using two real-time PCR tests (qPCR-16S and qPCR-mip) as previously described (Maurin, Hammer, et al. 2010, Wellinghausen, Frost et Marre 2001, Joly, et al. 2006). Briefly, the qPCR-16S targeting the 16SrRNA encoding gene allows amplification of DNA from all *Legionella* species, whereas the qPCR-mip specifically amplifies the *L. pneumophila mip* gene. The PCR protocols were as previously described (Maurin, Hammer, et al. 2010). A home-made internal inhibitory control (CI-Duo) corresponding to a 374-bp fragment of lambda DNA with terminal sequences complementary to the 16S rDNA and *mip* primers was used (5000 copies per reaction) to check for the presence of DNA polymerase inhibitors (Maurin, Hammer, et al. 2010).

The PCR mixtures for the qPCR-16S and qPCR-mip contained 5 µL of DNA extract, 2µL (5pmol) of primers *16S*-FW/*16S*-RV or *mip*-FW/*mip*-RV,1 µL (5.000 copies) of CI-Duo, 2µL

(4 pmol) of probes *16S*1/*16S*2 or *mip*1/*mip*2, 0.5 µL of UDG, 2.4 µL of MgCl2 at 25mMol/L, 2 µL of master hybridization probe reaction mix (Roche), 5.1 µL PCR-grade sterile water to obtain a final volume of 20 µL. DNA amplification and quantification was carried out using a Light-Cycler 2.0 instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France), with the following conditions: 8 min at 95°C as an initial denaturation step followed by 45 cycles of denaturation (10 sec at 95°C), annealing (10 sec at 57°C), and polymerization (15 sec at72°C). Each PCR protocol included a negative extraction control (PCR-grade water) and a positive control (DNA from *L. pneumophila* serogroup 1 Paris strain).

Prognosis criteria and statistical analysis

We tried to correlate the *L. pneumophila* DNA load in respiratory samples determined in group A patients with the following criteria: the Fine's score (Fine, et al. 1997) of pneumonia severity at the time of hospital admission for the 116 legionellosis patients; the APACHE II score (Knaus, et al. 1985) at admission for ICU patients; patients' age and sex; the need for ICU admission; the length of hospital and/or ICU stay; the length of tracheal intubation for ICU patients; the death rate. The statistical significance of the correlation between these variables and the *L. pneumophila* DNA load was determined using the student test (bilateral).

We also tentatively correlated the kinetics of *Legionella* DNA loads determined in group B patients with the following criteria: the Fine's score, at the time of hospital/ICU admission for the 116 legionellosis patients; the APACHE II score for ICU patients; the length of hospital and/or ICU stay; the length of tracheal intubation for ICU patients; the clinical response to treatment and the final outcome of these patients. Statistical analyses were performed using the Pearson correlation coefficient test.

RESULTS

***L. pneumophila* DNA load in group A patients**

The two qrt-PCR tests were positive (for at least one respiratory sample during hospitalization) in 84 of 116 (72.4%) group A patients. The fact that both qrt-PCR tests were positive confirmed that all patients were infected with a *L. pneumophila* strain. The *L. pneumophila* DNA burden in respiratory samples collected at the time of hospital admission in 38 cases using the qPCR-16S test and qPCR-mip test were highly correlated (Figures 1 and 4).

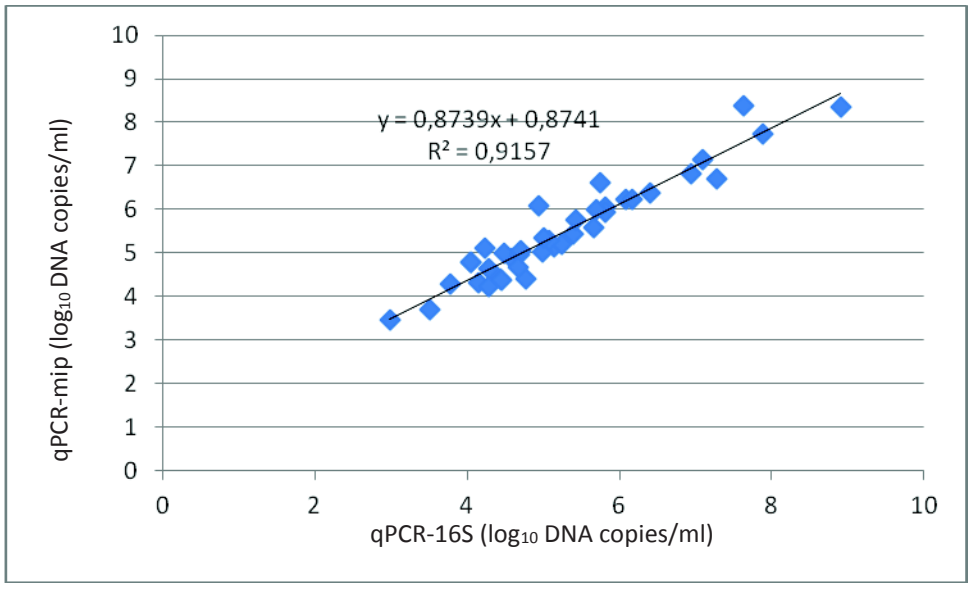


Figure1: correlation between bacterial burden detected by qPCR-16S, and qPCR-mip at the time of admission

For all 116 patients, the mean *Legionella* burden ± SD for the qPCR16S test was 7.3 ± 7.6 $\log_{10}$ DNA copies/ ml of sample. The range was between 9.1 $\log_{10}$ copies/ml and 2.3 $\log_{10}$ DNA copies/ml. The mean *Legionella* burden ± SD for the qPCRmip test was 8 ± 7.3 $\log_{10}$ DNA copies/ml. The range was between 8.8 and 2.3 $\log_{10}$ copies/ml. We observed a very good correlation between the values of the DNA burden determined by qPCR-16S and qPCR-mip assays, with the following linear equation: y = 0.8838 + 0.789, with R^2 = 0,9142 (Figure 2).

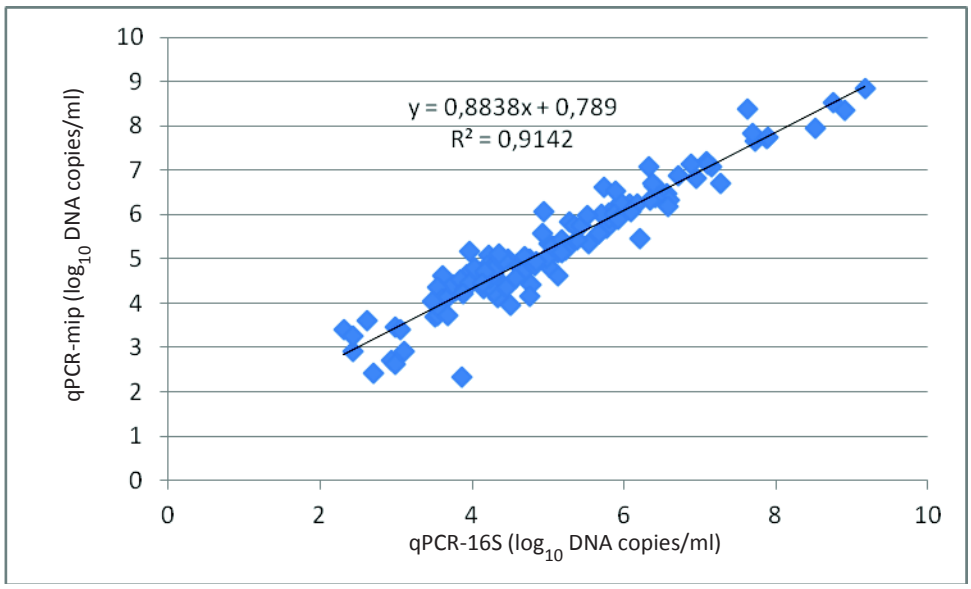


Figure 2: Correlation between the bacterial loads detected by qPCR-16S and qPCR-mip

The Fine class of pneumonia severity was 2 for 9 patients, 3 for 27 patients, 4 for 25 patients, 5 for 20 patients and undetermined for the remaining 35 patients. We found no statistically significant correlation between the Fine class and bacterial loads determined either by the qPCR-16S test (p=0.41) or the qPCR-mip test (p=0.25)

The length of hospitalization was ≥ 14 days for 34 out of 83 patients with a defined period and <14 days for the remaining 49 patients. No statistically significant correlation was found between the length of hospital stay and bacterial loads determined either by the qPCR-16S test (p=0.3) or the qPCR-mip test (p=0.9).

The mortality rate was 6.9% (i.e., 5 deaths out of 72 patients for which outcome were known). Death was correlated with a high bacterial load as determined by the qPCR-16S test (p=0.001) or the qPCR-mip test (p<0.001).

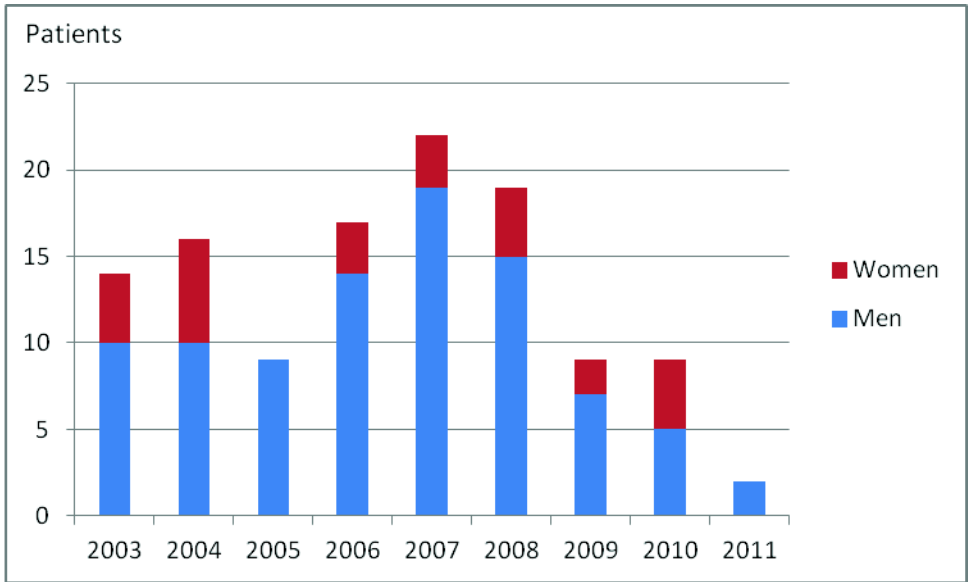


Figure 3: Study patients distributed on years

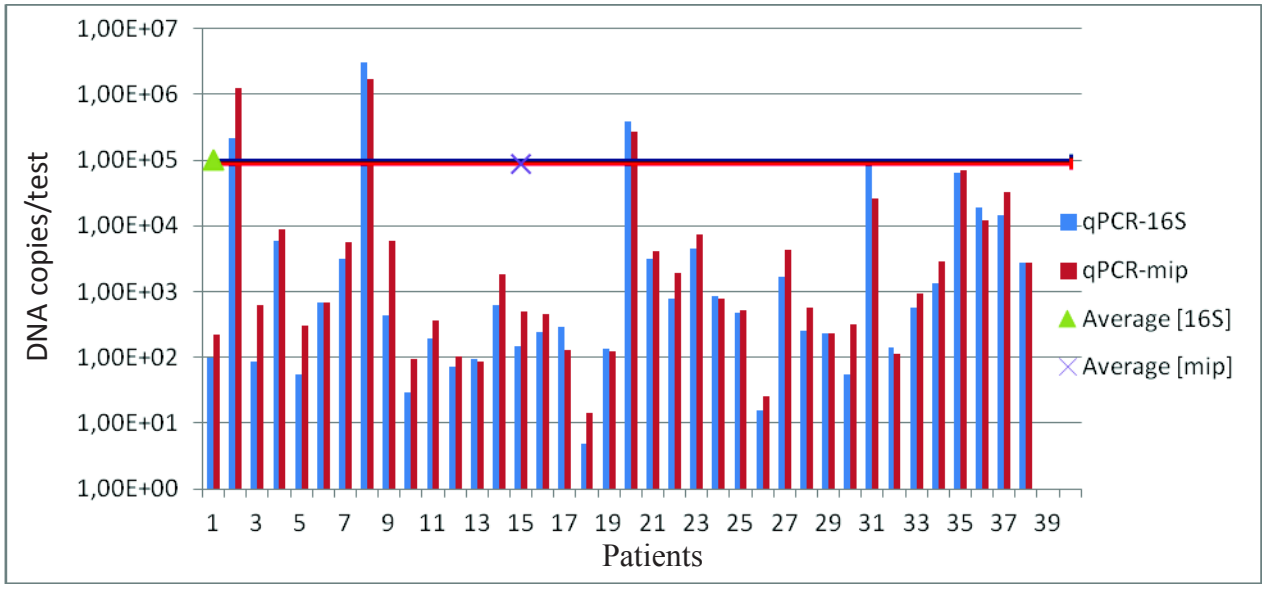


Figure 4: the bacterial burden at the time of admission distributed on the 38 patients

We noted that the *L. pneumophila* DNA load and relative standard deviation at the time of hospital admission varied according to the type of respiratory sample investigated. Bacterial loads in sputum were on average lower and had a higher relative SD as compared to tracheal aspirates (Figure 5).

Tableau 1: the average+/- SD and the relative SD to the bacterial load at the time of admission

	qPCR-16S tracheal aspirates	qPCR-16S sputum	qPCR-mip tracheal aspirates	qPCR-mip sputum
Average (log_{10} copies/ml)	7.9	6.4	7.7	6.9
SD	8.1	6.6	7.8	7.2
Relative SD=SD/average	1.02	1.03	0.12	1.04

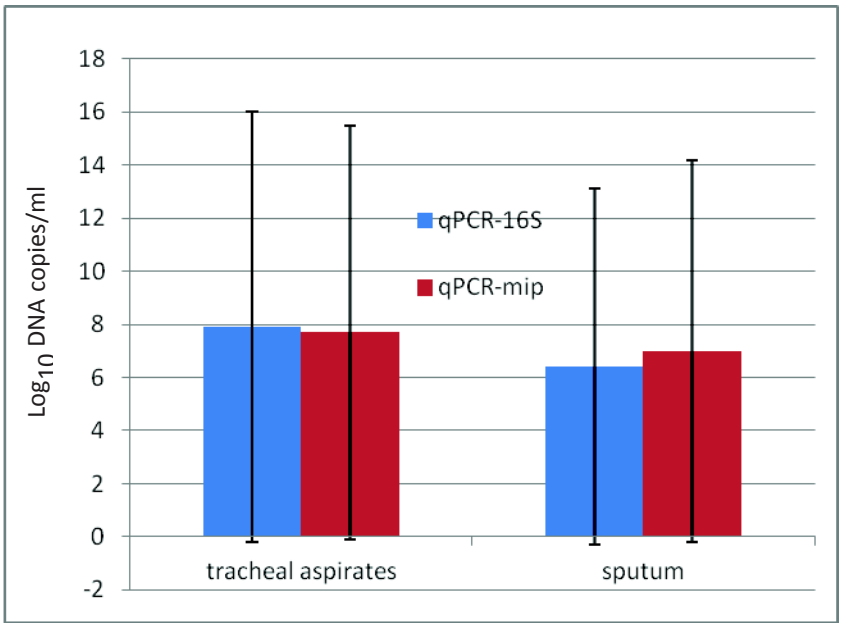


Figure 5: Average and SD distributed by the type of samples

Kinetics of *L. pneumophila* DNA load in group B patients

For 24 patients we followed up the kinetics of the bacterial load over time, while patients were receiving appropriate antibiotic therapy for legionellosis. The collected profile of kinetics showed an ability to differentiate patients who responded quickly to antibiotic treatment and improved rapidly the first week of hospitalization from those who had a modest clinical response to treatment and require prolonged hospitalization or even died. In addition, we were able to link the different kinetic profiles of DNA burden with some of the severity criteria we evaluated: the Fine score at admission, the need for admission to the intensive care unit, length of stay in ICU, and mortality. These kinetic profiles strongly correlated with the

values of the bacterial loads at the time of admission in the case of absence of other factors using Pearson correlation coefficient.

The first kinetic profile corresponded to a low bacterial burden at hospital admission (10^3-10^4 DNA copies/test= 5.3- 6.3 $\log_{10}$ DNA copies/ml), and a rapid decrease of the DNA burden associated with good patient's recovery during the first week of hospitalization, without the need of admission in ICU.

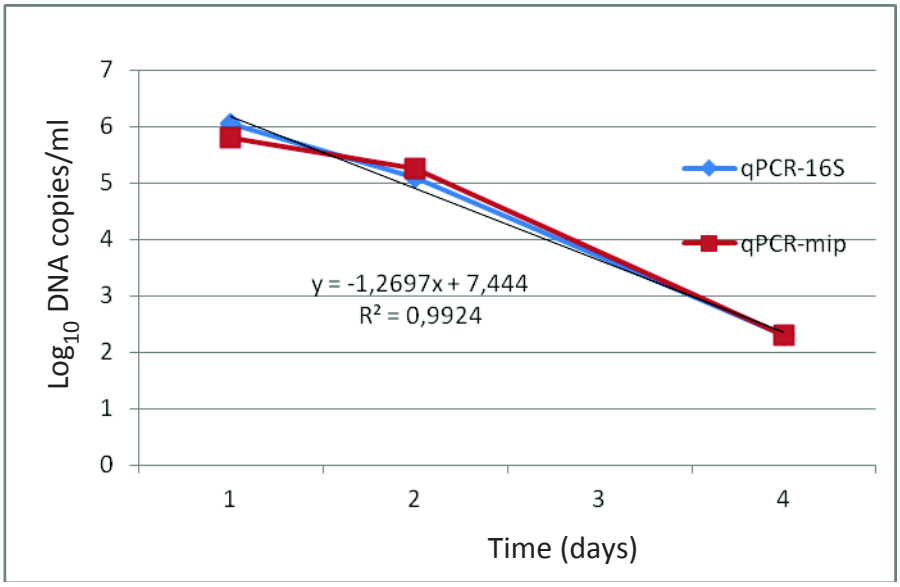


Figure 6: Profile 1, Rapid decrease of the DNA burden during the first week of hospital admission

The second profile corresponded to a bacterial load at admission between 10^3 to 10^5 DNA copies per test (i.e., 2×10^5-2×10^7 DNA copies/ml of sample= 5.3-7.3 $\log_{10}$ DNA copies/ml). These patients had a longer stay in hospital up to two weeks with a slow decrease for the kinetic profile (7 patients).

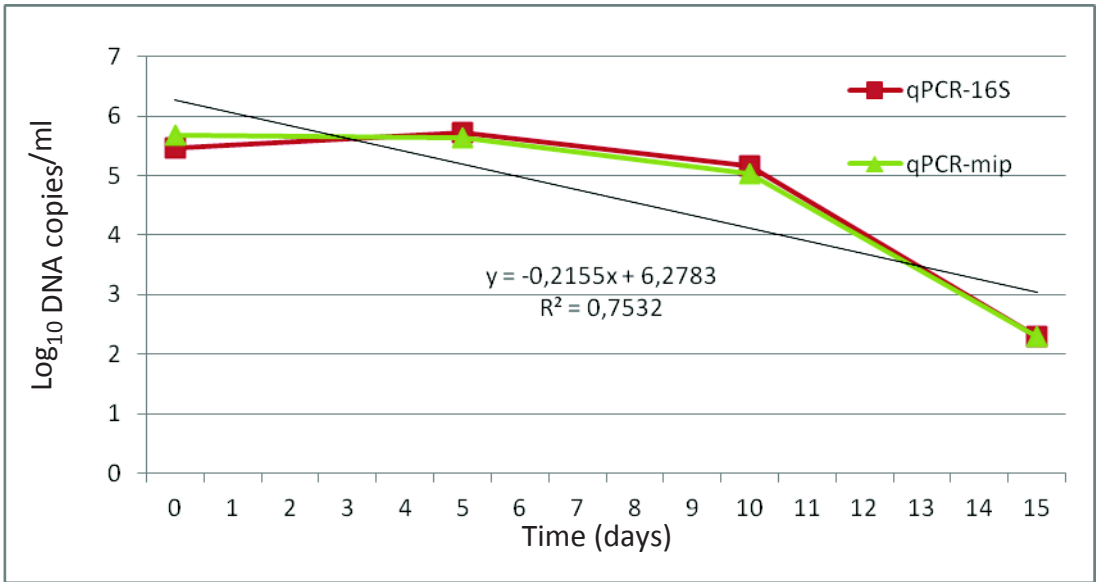


Figure 6: profile2, Slow decrease of the bacterial load with a long hospitalisation

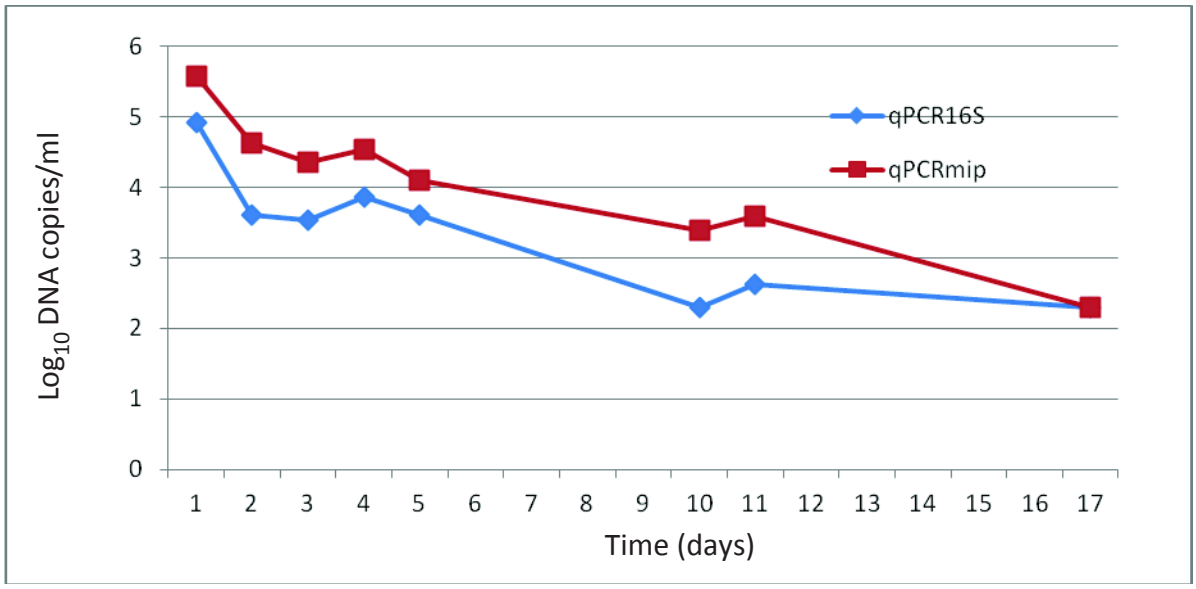


Figure 7: example of profile 2

Finally, a third profile corresponded to a high bacterial load at admission ($\geq 10^6$ DNA copies/test= 2×10^8 DNA copies/test= 8.3 $\log_{10}$ DNA copies/ml) that remained stable over time in patients receiving an appropriate antibiotic therapy (Figure 8). In these patients, the clinical state improved very slowly, and a very long stay in ICU was needed. All these patients died. For these patients, we observed that isolation of *Legionella* strain by *Legionella* culture was positive at the time of admission, and the Fine Score was 4 or 5. This suggested a good

correlation between the kinetic of bacterial load and these criteria (Fine class, a positive culture, and a higher age), but more cases belonging to the same profile are probably needed to obtain statistically significant results.

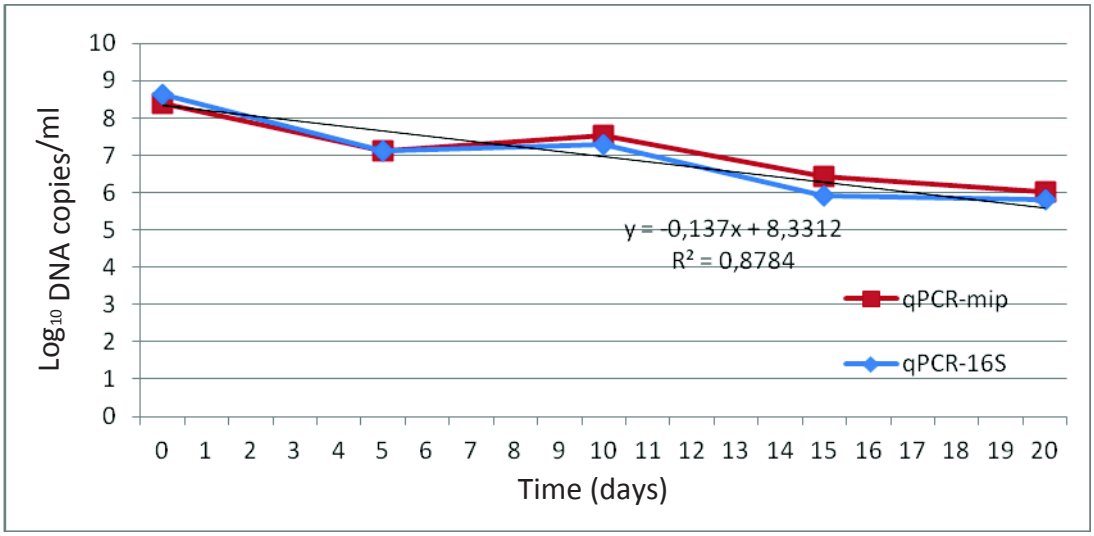


Figure 8: profile 3, Stable high bacterial load over time

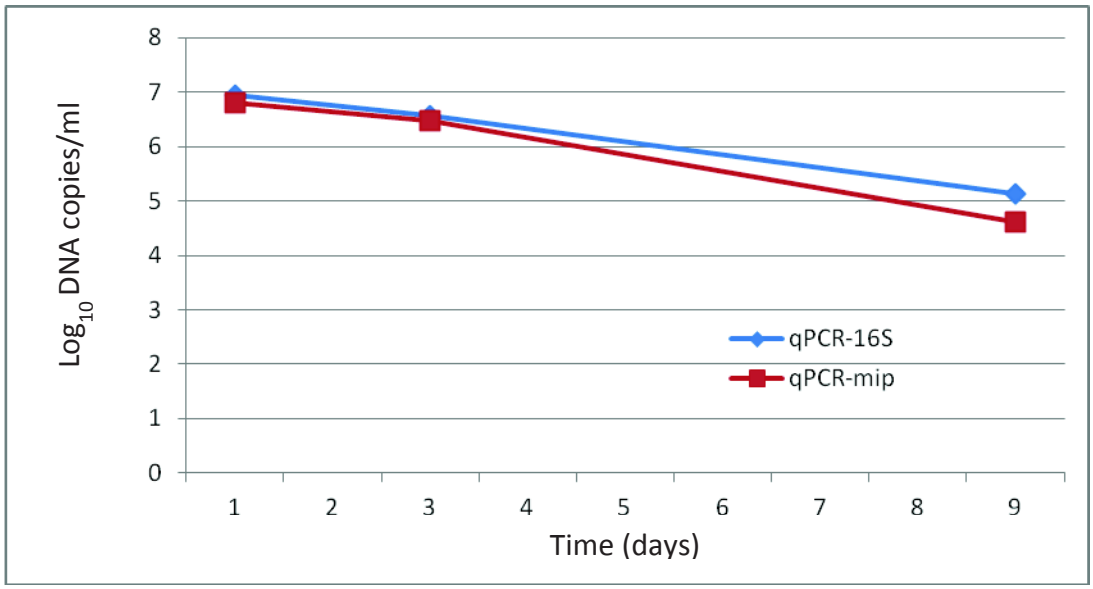


Figure 9: example1 of profile 3

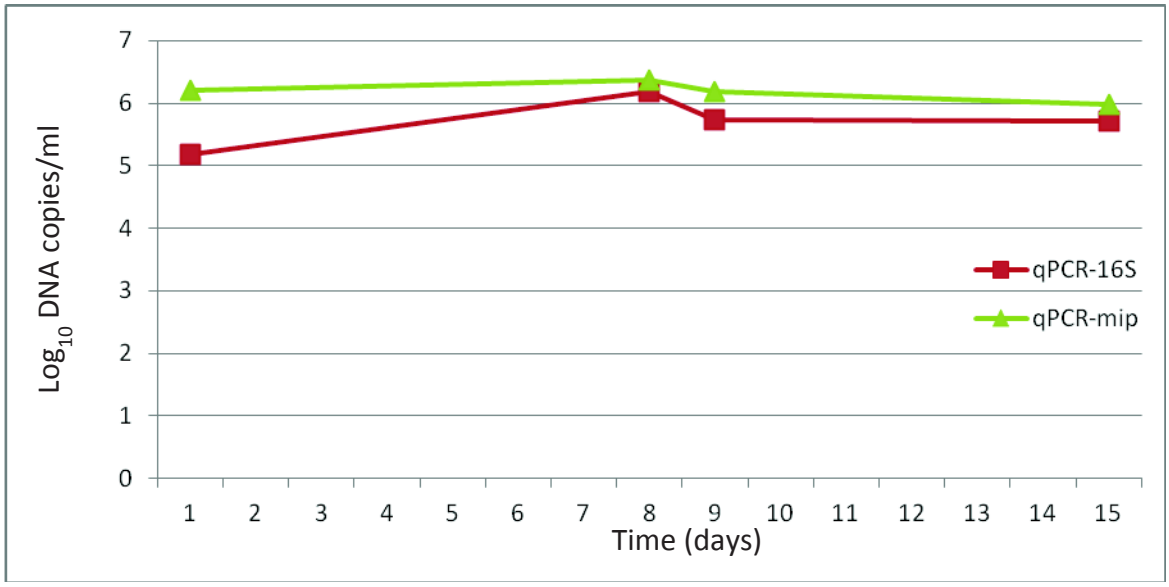


Figure 10, exemple 2 of profile 3

DISCUSSION

Our real-time PCR tests seem to be interesting tools for evaluation of legionellosis prognosis. They allowed us to determine the severity of the disease in legionellosis patients according to the bacterial load at the time of admission. Hence, we found a correlation between the bacterial loads at the time of admission with the death rate. In contrast, we could not confirm the correlation of a high bacterial load as the single factor with the need of admission in ICU or the length of hospitalization. Although, a high bacterial load was found in patients requiring admission in the intensive care unit, a larger population of legionellosis patients is probably needed to obtain a statistically significant correlation. Also, several associated factors such as the patient's previous health status, the sex, the age, the causative strain and the occurrence of superinfection in the ICU should probably interfere with the final outcome.

In this study, we also tried to distinguish different kinetic profiles of evolution of the bacterial load over time, during antibiotic treatment. We could differentiate three different profiles, that corresponded to rapid recovery, recovery after prolonged hospitalization and fatal outcome, respectively. Patients who had a high *Legionella* DNA load in their respiratory samples, which remained stable after at least three days of appropriate antibiotic treatment, were more prone to evolved to prolonged hospitalization and occasionally death. Although treatment

optimization according to results of qPCR tests was not performed in this study, we retrospectively noted that changes in the antibiotic therapy occurred more frequently in the later patients. Thus the monitoring of the kinetics of the bacterial burden during hospitalization could offer an opportunity to evaluate treatment efficacy and better predict the final prognosis in legionellosis patients requiring ICU admission. In case of delayed diagnostic, we also expect that the bacterial load would be higher at the time of hospitalization, and thus correlate with a worse prognosis. This would have to be determined in further studies.

We have previously demonstrated that *L. pneumophila gyrA83* mutants occurred in vivo in legionellosis patients treated with a fluoroquinolone (Shadoud et al. submitted for publication). Because the frequency of occurrence of antibiotic resistance mutations is usually stable in a given bacterial species, except for hypermutator strains, it is likely that *gyrA83* mutations may primarily occur in patients infected with high bacterial loads. Thus, it is advisable to recommend testing severe legionellosis cases requiring ICU admission using both the qPCR-mip and/or qPCR-16S assays for monitoring the *Legionella* DNA burden during hospitalization, but also the qPCRgyrALp to detect the emergence of fluoroquinolones – resistant mutants. The combination of both types of qrt-PCR tests would improve therapeutic management of these patients, and hopefully their final outcome.

Some limits of our qrt-PCR strategy come from patients that are not able to produce suptum samples. However, because severe patients are often intubated and ventilated, tracheal and bronchial aspirates are more easily obtainable for determination of the kinetics of bacterial burden over time. More importantly, the *Legionella* burden varied according to the quality of the collected respiratory sample, especially with significant lower loads in bronchoalveolar lavage fluids. This implies a better standardization of the collected clinical samples and define criteria for rejection of improper respiratory samples.

In conclusion, the qPCR-mip and qPCR-16S assays are useful tools that may implement current diagnostic tests for legionellosis. They may be used for two purposes, as early diagnostic tools in legionellosis patients whatever the *Legionella* species involved, and as prognostic tools for patients infected with *L. pneumophila*. In the latter case, the primary goal would be to better adapt antibiotic therapy and further improve the prognosis of this disease. The qPCRgyrALp test may also serve to monitor the emergence of antibiotic resistances in environmental strains of *L. pneumophila*.

REFERENCES

Bruin, JP, EPF IJzerman, JW den Boer, JW Mouton, et BMW Diederen. «Wild type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroep 1 isolates.» *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012: 72:103–8.

Carratalà, J, et C Garcia-Vidal. «An update on Legionella.» *Curr Opin Infect Dis*, 2010: 23(2):152–7.

Diederen, BM. «*Legionella spp* and legionellaires'diseasase.» *J Infect*, 2008: 56(1): 1-12.

Fields BS, Benson RF, Besser RE. «*Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation.» *Clin Microbiol Rev*, 2002: 5: 506–526.

Fine, MJ, TE Auble, DM Yealy, et al. «A prediction rule to identify low risk patients with community-acquired pneumonia.» *N Engl J Med*, 1997: 336: 243–250.

Gacouin, a, et al. «sever pneumonia due to *Legionella pneumophila* : prognostic facteurs, impact of delayed appropriate antimicrobial therapy.» *Intensiv Care Med*, 2002: 28(6) : 686-91.

Jespersen, S, OS Sogaard, HC Schonheyder, HJ Fine, et L Ostergaard. «Clinincal features and predictors of mortality in admitted patient with commiunity- and hospital-acquired legionellosis: a Danich historical cohort study.» *BMC Infect Dis*, 2010: 10: 124.

Joly, P, PA Falconnet, J Andre, et al. «Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation.» *Appl Environ Microbiol*, 2006: 72: 2801–2808.

Knaus, WA, EA Draper, DP Wagner, et JE Zimmerman. «APACHE II: a severity of disease classification system.» *Critical Care Medicine*, 1985: 13 (10): 818–29.

Koide, M, F Higa, M Tateyama, H Sakugawa, et A Saito. «Comparison of polymerase chain reaction and two urinary antigen detection kits for detecting *Legionella* in clinical samples.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004: 23(3):221-3.

Lettinga, KD, A Verbon, PT Nieukerk, BP Jersons, JM Prins, et al. «Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder among survivors of an outbreack of Legionnaires'disease .» *Clin Infection Dis*, 2002: 35(1):11-7.

Matsiota-Bernard, P, S Waser, et G Vrioni. «detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia.» *Clin Infect Dis*, 2000: 6(4) : 223-5.

Maurin, M, et al. «Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis.» *Clin Microbiol Infect*, 2010: 16(4):379-84.

Murdoch, DR, et al. «Use of the polymerase chaine reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia.» *Clin Infect Dis*, 1996: 23(3) : 475-80.

Murdoch, DR, et al. «Use of the polymerase chaine reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia.» *Clin Infect Dis*, 1996: 23(3) : 475-80.

Mykietiuk, A, et al. «Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella pneumophila* in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy.» *Clin Infect Dis*, 2005: 40(6) : 794-9.

Newton, HJ, DKY Ang, IR van Driel, et EL Hartland. «Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*.» *Clin Microbiol Rev*, 2010: 23(2):274–98.

Stolhaug, A, et K Bergh. «Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella spp*. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing.» *Appl Environ Microbiol*, 2006: 72(9): 6394-8.

Stout, JE, et VL Yu. «Legionellosis.» *N Engl J Med*, 1997: 337(10): 682-7.

Wellinghausen, N, C Frost, et R Marre. «Detection of *legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR.» *Appl Environ Microbiol*, 2001: 67: 3985–3993.

Wilson, DA, B Yen-Lieberman, IU Reisch, SM Gordon, et Procop, et GW. «Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene.» *J Clin Microbiol*, 2003: 41(7):3327-30.

Woodhead, W. «Community_acquired pneumonia in Europe : causative pathogens and resistance patterns.» *Eur Respir J Suppl*, 2002: 36 :20s-7s.

Zimmerman, SE, ML French, SD Allen, E Wilson, et RB Kohler. «Immunoglobulin M antibody titers in the diagnosis of Legionnaires disease.» *J Clin Microbiol*, 1982: 16(6):1007-11.

Discussion générale et perspectives

La légionellose est une maladie bactérienne qui se manifeste par une pneumonie potentiellement fatale (Fields, Benson et Besser 2002). Les formes graves de cette maladie s'observent plus souvent chez des patients immunodéprimés, mais également chez des sujets sains, en particulier en cas de retard diagnostique et thérapeutique (Roige et Rello 2003, Sandkovsky, et al. 2008). De ce fait la mortalité liée à la légionellose demeure élevée, proche de 10-15% globalement, mais supérieure à 30% chez les patients présentant un terrain immunodéprimé ou une pathologie associée (A. e. Mykietiuk 2005, Jespersen, Sogaard, et al. 2010). Le traitement antibiotique de la légionellose repose actuellement sur les fluoroquinolones et les macrolides, actifs à la fois sur les formes extracellulaires et intracellulaires de ces bactéries (Lettinga, et al. 2002, Gacouin et al 2002). La sensibilité *in vitro* des *Legionella* à ces antibiotiques est stable puisqu'aucun mutant résistant n'a été isolé en situation clinique jusqu'à présent. L'absence d'émergence de résistances aux antibiotiques chez les *Legionella* pourrait s'expliquer par une niche écologique restreinte (amibes, biofilms), l'absence d'infection décrite chez les animaux et l'absence de transmission interhumaine de ces bactéries. Pourtant, les fluoroquinolones et les macrolides sont utilisés depuis plusieurs décennies pour traiter les patients atteints de légionellose (Pedro-Botet et Yu 2006), et des concentrations résiduelles de ces molécules sont détectées dans les sols et les milieux aquatiques (Sukul et Spiteller 2007), réservoirs naturels de ces bactéries. D'autre part, nous savons actuellement que des échanges horizontaux de gènes de résistance aux antibiotiques existent entre différentes espèces bactériennes, à la fois au niveau de leur réservoir humain, animal et environnemental (Martínez 2008). Des transferts horizontaux de gènes ont mêmes été décrits *in vitro* entre espèces bactériennes infectant les amibes (Skippington et Ragan 2011). Enfin, des mutants résistants aux antibiotiques ont été

sélectionnés aisément in vitro chez *L. pneumophila* (Almahmoud, et al. 2009, Dowling, McDevitt et Pasculle 1985).

L'ensemble de ces données suggèrent que la possibilité de sélection des mutants résistants aux antibiotiques chez les *Legionella*, *in vivo* chez les patients infectés et/ou dans l'environnement. Nous avons testé cette hypothèse concernant les fluoroquinolones, antibiotiques utilisés en première ligne au cours des formes graves de légionellose. Dans une étude préalable (Almahmoud, et al. 2009) nous avons montré la possibilité de sélectionner *in vitro* des mutants résistants aux fluoroquinolones chez *L. pneumophila*, puis nous avons caractérisé les mécanismes génétiques de ces résistances. Les mutations affectant le QRDR de *gyrA* étant les plus précoces te les plus significatives en termes de niveau de résistance, nous avons développé au cours de notre premier travail un test de PCR en temps réel capable de détecter ces mutations à partir de souches isolées ou surtout directement dans des prélèvements cliniques. Ce travail nous a permis de confirmer pour la première fois, par une approche moléculaire combinant les techniques de PCR en temps réel et de séquençage haut débit, la possibilité de sélection de mutants résistants aux fluoroquinolones (mutation *gyrA83*) *in vivo* chez les patients infectés et traités par une fluoroquinolone. Les deux patients infectés par ces souches mutantes ont nécessité une hospitalisation prolongée. Toutefois, l'impact clinique de la résistance aux fluoroquinolones a probablement été atténué par le fait que l'antibiothérapie administrée comportait également un macrolide. Il sera nécessaire de confirmer ces résultats chez d'autres séries de patients et d'évaluer l'incidence réelle de ces résistances chez les patients infectés par *L. pneumophila* ou une autre espèce de ce genre. L'impact clinique de ces résistances devra également être défini sur un plus grand nombre de patients. Toutefois cette découverte peut avoir de nombreuses conséquences pour la prise en charge des patients atteints de légionellose. D'une part elle justifie l'utilisation systématique d'une association d'antibiotiques au moins au cours des formes gaves de légionellose afin d'éviter l'émergence de ces résistantes. D'autre part, elle implique la recherche de ces mutants

en cas d'échec thérapeutique. Elle incite également à recherche d'autres types de mutations de résistances aux fluoroquinolones mais également aux macrolides. Enfin, elle rend nécessaire le développement et l'utilisation d'outils diagnostiques permettant d'évaluer l'efficacité de l'antibiothérapie et en fine de prédire le pronostic de ces patients.

Le test qPCRgyrALp a été utilisé pour dépister l'existence de mutants résistants aux fluoroquinolones chez des souches environnementales de *L. pneumophila*, collectées dans les réseaux d'eau du CHU de Grenoble ou de plusieurs sites différents en Isère. Ces souches étaient sensibles aux fluoroquinolones en méthode phénotypique E-test. En appliquant le test qPCRgyrALP à l'ensemble de ces souches environnementales nous avons obtenu un profil pouvant évoquer une mutation *gyrA83*, c'est-à-dire au niveau du codon 83 du QRDR de *gyrA* chez quatre souches sur les 48 testées. En fait, l'amplification et le séquençage du gène *gyrA* chez ces souches a montré l'absence de mutation *gyrA83*, mais une mutation entraînant un mésappariement au niveau de la sonde d'ancrage du test qPCRgyrALp et donc une diminution du pic de fusion sans rapport avec une résistance aux fluoroquinolones. Ces résultats faux positifs montrent la nécessité d'améliorer la spécificité de notre test de détection des mutations du QRDR de *gyrA*. Des tests ciblant spécifiquement les mutations *gyrA83* ou *gyrA87* responsables de la résistance aux fluoroquinolones devront être développés. L'absence de mise en évidence de mutants résistants aux fluoroquinolones parmi les souches environnementales de *L. pneumophila* n'élimine pas formellement l'existence de ce type de souches. Ce type de travail devra être renouvelé dans différents environnements hydriques.

La découverte de mutants résistants aux antibiotiques *in vivo* renforce la nécessité de développer un outil permettant à la fois d'évaluer la réponse au traitement antibiotique et le pronostic final chez les patients atteints de légionellose. La technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR) offre la possibilité de détecter les *Legionella* dans les prélèvements

respiratoires des patients infectés et de quantifier la charge bactérienne initiale et au cours du traitement antibiotique. Cette technique permet donc à la fois un diagnostic rapide de légionellose, quelle que soit l'espèce de *Legionella* en cause, mais aussi une évaluation pronostique et une prise en charge personnalisée des patients.

Nous avons utilisé cette technique pour la détection et la quantification de *L. pneumophila* dans les prélèvements respiratoires collectés de patients hospitalisés pour légionellose au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble entre 2003 et 2011. Nous avons ciblé dans cette étude des patients infectés par *L. pneumophila* et vraisemblablement de sérogroupe 1.

Deux tests de qPCR, ciblant soit le gène codant pour l'ARNr16S (qPCR-16S) soit le gène *mip* (qPCR-mip) ont été appliqués sur différents prélèvements des voies ariennes inférieures collectés chez les patients lors de leur admission, puis pour certains d'entre eux au cours de leur hospitalisation pendant le traitement antibiotique. La charge bactérienne à l'admission des patients semble corrélée à la gravité initiale de la maladie et au pronostic final des patients, mais ces données devront être confirmées par l'étude d'un plus grand nombre de patients. Les cinétiques recueillies montrent la possibilité de différencier les patients en trois groupes ; 1/ le groupe des patients qui répondent rapidement au traitement antibiotique et évoluent favorablement au cours de la 1ère semaine d'hospitalisation ; 2/ le groupe des patients qui présentent une réponse retardée au traitement antibiotique et qui nécessitent une hospitalisation prolongée ; 3/ le groupe des patients qui présentent une charge bactérienne initiale très élevée, stable au cours du temps malgré une antibiothérapie adaptée, qui présentent une amélioration clinique lente et nécessitent une hospitalisation de longue durée, voire décèdent. Si le nombre de profils obtenus ne permet pas une conclusion définitive, il semble donc exister une corrélation entre l'évolution de la charge bactérienne à *L. pneumophila* au cours du traitement antibiotique et la réponse au traitement antibiotique, l'amélioration clinique et le pronostic final des patients hospitalisés pour légionellose.

En conclusion, nous avons élaboré au cours de nos travaux personnels des tests moléculaires pouvant servir de marqueurs diagnostiques et pronostiques de la légionellose. Ces tests nous ont permis de montrer pour la première fois la sélection *in vivo* de résistances aux antibiotiques (en particulier aux fluoroquinolones) chez *L. pneumophila*. L'évaluation de la charge bactérienne à *L. pneumophila* au cours du traitement antibiotique permettra de cibler les situations d'échecs impliquant une recherche de mutants résistants dans les prélèvements respiratoires des patients infectés. L'intérêt clinique réel de ces différents tests devra cependant être validé par l'étude d'autres cohortes de patients, dans des zones géographiques différentes. La légionellose étant une maladie relativeùent peu fréquente, une approche multi-centrique est indispensable.

BIBLIOGRAPHIE

Abu Kwaik, Y, et LL Pederson. «The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages.» *Mol Microbiol*, 1996: 21: 543-556.

Abu Kwaik, Y, LY Gao, OS Harb, et BJ Stone. «Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant.» *Mol Microbiol*, 1997: 24: 629-642.

Abu-Zant, A, et al. «Antiapoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*.» *Cell Microbiol* , 2007: 9: 246-264.

Adeleke, A, J Pruckler, Benson.R, T Rowbotham, M Halablab, et B Fields. «*Legionella-like amebal* pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease.» *Emerg Infect Dis*, 1996: 2(3): 225–230.

Adeleke, AA, et al. «*legionella drozanskii sp*. nov., *Legionella rowbothamii sp*. nov. and *Legionella falloniisp*. nov.: three unusual new *Legionella* species.» *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001: 51(Pt 3) : 1151-60.

Albert-Weissenberger, C, T Sahr, O Sismeiro, J Hacker, K Heuner, et C Buchrieser. «Control of flagellar gene regulation in *Legionella pneumophila* and its relation to growth phase.» *J Bacteriol*, 2010: 192:446-455.

Alekshun, MN, et SB Levy. «Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro.» *J Bacteriol*, 1999: 181(15): 4669-72.

Alekshun, MN, et SB Levy. «Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1997: 41(10): p. 2067-75.

Al-Khodor, S, S Kalachikov, I Morozova, C. T Price, et Y Abu Kwaik. «The PmrA/PmrB two-component system of *Legionella pneumophila* is a global regulator required for intracellular replication within macrophages and protozoa.» *Infect Immun*, 2009: 77:374-3.

Allard, KA, et al. «Purification of Legiobactin and importance of this siderophore in lung infection by *Legionella pneumophila*.» *Infect Immun*, 2009: 77: 2887-2895.

Allard, KA, VK Viswanathan, et NP Cianciotto. «lbtA and lbtB are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin.» *J Bacteriol* , 2006: 188: 1351-1363.

Almahmoud, I, E Kay, D Schneider, et M. Maurin. «Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*.» *J Antimicrob Chemother*, 2009: 64(2):284–93.

Almiron, M, AJ Link, D Furlong, et R Kolter. «A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*.» *Genes Dev*, 1992: 6: 2646-2654.

Alonso, A, et JL Martinez. «Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2001: 45(6): 1879-81.

Altman, E, et G Segal. «The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila* icm/dot components as well as new translocated substrates.» *J Bacteriol*, 2008: 190: 1985-1996.

Anderson, BB, et I Sogaard. «Legionnaires'disease and brain abscess.» *Neurology*, 1987: 37(2) : 333-4.

Aoyama, H, et al. «Norfloxacin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1987: 31(10): 1640-1.

Aragon, V, O Rossier, et NP Cianciotto. « *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities.» *Microbiology (Reading, Engl)*, 2002: 148: 2223-2231.

Arai, M, et al. «[Evaluation of Dipstick 'Eiken' Legionella for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 urinary antigen using the immunochromatographical method].» *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi*, 2005: 16(1): 29-35.

Aurel, l H, et al. « *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France.» *J Clin Microbiol*, 2003: 41: 3320-3322.

Balke, VL, et JD Gralla. «Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*.» *J Bacteriol*, 1987: 169: 4499-4506.

Ballard, AL, et al. «Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridation assay.» *J Clin Microbiol*, 2000: 38(11) : 4215-8.

Baltch, A.L, et al. «Antibacterial effect of telithromycin (HMR 3647) and comparative antibiotics against intracellular *Legionella pneumophila*.» *J Antimicrob Chemother*, 2000: 46(1): 51-5.

Bandyopadhyay, P, B Byrn, Y Chan, MS Swanson, et HM Steinman. « *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages.» *Infect Immun*, 2003: 71: 4526-4535.

Bandyopadhyay, P, et HM Steinman. « *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the *katB* gene and studies of KatB function.» *J bacteriol*, 1998: 180: 5369-5374.

Bandyopadhyay, P, S Liu, CB Gabbai, Z Venitelli, et HM Steinman. «Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related.» *Infect Immun*, 2007: 75: 723-735.

Bangsborg, JM, GH Shand, K Hansen, et JB Wright. «Performance of four different indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Asseys(ELISAs) to detect specific IgG, IgA, and IgM in Legionellaires'disease.» *Apmis*, 1994: 102(7) : 501-8.

Baquero, F, JL Martinez, et R Canton. «Antibiotics and antibiotic resistance in water environments.» *Curr Opin Biotech*, 2008: 19:260-265.

Barker, JE, et ID Farell. «The effects of signle and combined antibiotics on the growth of the *Legionella pneumophila* using time- kill studies.» *J Antimicrob Chimother*, 1990: 26(1): 45-53.

Bellinger-Kawahara, C, et MA Horwitz. «Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human moncytes.» *J Exp Med*, 1990: 172: 1201-1210.

Bellmann-Weiler, R, M Ausserwinkler, K Kurz, I Theurl, G Weiss, et al. «Clinical potential of c-reactive protein and procalcitonin serum concentrations to guide differential diagnosis and clinical managemet of pneumococcal and legionella pneuophila.» *J Clin microbiol*, 2010: 48(5): 1915-7.

Bemer, P, S Leautez, E Ninin, S Jarraud, F Raffi, et H Drugeon. « *Legionella pneumophila* arthritis : use of medium specific for mycobacteria for isolation of L.pneumophila in culture of articular fluid specimens.» *Clin Infect Dis*, 2002: 35(1) : E6-7.

Benin, AL, RF Benson, et RE Besser. «Trends in legionellaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis.» *Clin Infect Dis*, 2002: 35(9):1039-46.

Benson, RF, t Rowbotham, I Bialkwska, D Losas, JC Bulter, et Lipman HB & al. *95th Gen Meet Am Soc Microbiol*, 1995.

Benson, RF, et B.S Fields. «Classification of the genus Legionella.» *Semin Respir Infect*, 1998: 13(2): 90-9.

Benson, RF, PW Tang, et BS Fields. «Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of Legionella.» *J Clin Microbiol*, 2000: 38(7): 2763-5.

Berdal, BP, CE Farshy, et JC Feeley. «Detection of Legionella pneumonophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay.» *J Clin Microbiol*, 1979: 9(5): 575-8.

Berger, KH, et RR Isberg. «Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*.» *Mol Microbiol*, 1993: 7: 7-19.

Bhagwat, SS, et al. «In vitro activity of the quinolone WCK 771 against recent U.S. hospital and community-acquired Staphylococcus aureus pathogens with various resistance types.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2009: 53(2): 811-3.

Birtles, RJ, TG Harrison, D Samuel, et AG Taylor. «Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosing *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection.» *J Clin Pathol*, 1990: 43(8):685-90.

Blanco, S, et al. «Detection of *Legionella* antigen in nonconcentrated and concentrated urine samples by a new immunochromatographic assay.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008: 27: 1249-1251.

Blatch, AL, LH Bopp, RB Smith, PB Michelson, et WJ Ritz. «Antibacterial activity of gemifloxacin,levofloxacin, moxifloxacin and erythromycin aginst intracellular *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadiin* humain monocytes.» *J Antimicrob chemother*, 2005: 56(1) : 104-9.

Boldur, I, H Kahana, R Kazak, B Cwikel, et I Sarov. «Western blot analysis of immune response to *Legionella bozemanii* antigens.» *J Clin Pathol*, 1991: 44(11): p. 932-5.

Bopp, CA, JW Sumner, JK Morris, et JG Wells. «Isolation of *Legionella spp*. from environmental water samples by low-PH treatement and use of a selective medium.» *J Clin Microbiol*, 1981: 13(4) : 714-9.

Bornstein, N, J Fleurette, C Bebear, et G Chabanon. «Bacteriological and serological diagnosis of community-acquired acute pneumonia, specially Legionnaire's disease. Multicentric prospective study of 274 hospitalized patients.» *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 1987: 264(1-2): 93-101.

Boshuizen, HC, et al. «Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of Legionnaires disease.» *J Infect Dis*, 2001: 184(4):515-8.

Boshuizen, HC, JW Den Boer, de Melker H, et JF, Peeters MF, Van Vliet JA, and al Schellekens. «Referance values for the SERION classic ELISA for detecting *Legionella pneumophila* antibodies.» *Eur J Clin Microbiol*, 2003: 19(6) : 757-62.

Brady, MT. «Nosocomial legionnaires diseasein a children'shospital.» *J Pediatr* , 1989: 115(1) : 46-50.

Braun, JJ, et al. «Community-acquired pneumonia: pathogens and course in patients admitted to a general hospital.» *Ned Tijdschr Geneeskd*, 2004: 148(17): 836-40.

Breines, DM, S Ouabdesselam, EY Ng, J Tankovic, S Shah, et CJ Soussy. «Quinolone resistance locus nfxD of *Escherichia coli* is a mutant allele of the parE gene encoding a subunit of topoisomerase IV.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1997: 41(1):175-9.

Brenner, DJ. «Classification of Legionellaceae.Current status and remaining questions.» *Ist J Med Sci*, 1986: 22(9) :620-32.

Brenner, DJ, AG Steigerwalt, et JE McDade. « *Legionella pneumophila*, genus novum, spices nova, of the family legionellaceae, familia nova.» *Ann Intern Med*, 1979: 90 : 656-8.

Brenner, DJ, et al. « *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila subsp. pneumophila* subs. nov; *L.*

pneumophila subsp. fraseri subsp.nov; and *L. pneumophila subsp. pascullei* subs.nov.» *J Clin Microbiol*, 1988: 26: 1695-1703.

Brenwald, NP, et al. «Evidence for efflux pumps, other than PmrA, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*.» *Clin Microbiol Infect*, 2003: 9(2): 140-3.

Briñas, L, et al. «Beta-lactamase characterization in *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain.» *Microb Drug Resist*, 2003: 9(2):201-9.

Brüggemann, H, et al. «Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*.» *Cell Microbiol*, 2006: 8: 1228-1240.

Burnsed, LJ, et al. «A large, travel-associated outbreak of legionellosis among hotel guests: utility of the urine antigen assay in confirming Pontiac fever.» *Clin Infect Dis*, 2007: 44: 222-228.

Burstein, D, T Zusman, E Degtyar, R Viner, G Segal, et T Pupko. «Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approch.» *PLoS Pathog*, 2009: 5: e1000508.

Calbo, E, et J Garau. «[Antibiotic treatment for legionellosis].» *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2006: 24(6):357-9.

Cambau, E, et al. «Target specificity of the new fluoroquinolone besifloxacin in *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.» *J Antimicrob Chemother*, 2009: 63(3): 443-50.

Cambau, E, F Bordon, E Collatz, et L Gutmann. «Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1993: 37(6):1247-52.

Cambronne, ED, et CR Roy. «The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation.» *PLoS Pathog*, 2007: 3: e188.

Campese, C, et al. «Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France (1998-2008).» *Int J Infect Dis*, 2011: 15(1): e30-7.

Capoor, MR, et al. «Molecular analysis of high-level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi and S. Paratyphi A: need to expand the QRDR region.» *Epidemiol Infect*, 2009: 137(6): 871-8.

Carratalà, J, et C Garcia-Vidal. «An update on *Legionella*.» *Curr Opin Infect Dis*, 2010: 23(2):152–7.

Casin, I, J Breuil, JP Darchis, C Guelpa, et E Collatz. «Fluoroquinolone resistance linked to GyrA, GyrB, and ParC mutations in *Salmonella enterica typhimurium* isolates in humans.» *Emerg Infect Dis*, 2003: 9(11):1455-7.

Cattoir, V, et P Nordmann. «Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update.» *Curr Med Chem*, 2009: 16(8):1028-46.

Cazalet, C, et al. «Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease.» *PLoS Genet*, 2010: 6: e1000851.

Cazalet, C, et al. «Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functctions, and high genome plasticity.» *1at Genet*, 2004: 36: 1165-1173.

Champoux, JJ. «DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism.» *Annu Rev Biochem*, 2001: 70: 369-413.

Chen, DE, S Podell, J Sauer, MS Swanson, et MH Saier. «The phagosomal nutrient transporter (Pht) .» *family Microbiology (Reading, Engl.)*, 2008: 154: 42-53.

Chen, DQ, XC Zheng, et YJ Lu. « Identification and characterization of novel ColE1-type, high-copy number plasmid mutants in *Legionella pneumophila*.» *Plasmid*, 2006: 56(3): 167-78.

Chien, M, et al. «The genomic sequence of the acc.» *Science*, 2004: 305: 1966-1968.

Chu, YW, ET Houang, et AF Cheng. «Novel combination of mutations in the DNA gyrase and topoisomerase IV genes in laboratory-grown fluoroquinolone-resistant *Shigella flexneri* mutants.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1998: 42(11):3051-2.

Cianciotto, NP. « Iron acquisition by *Legionella pneumophila*.» *Biometals* , 2007: 20: 323-331.

Cianciotto, NP. «Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*.» *Future Microbiol*, 2009: 4: 797-805.

Cianciotto, NP. «Pathogenicity of *Legionella pneumophila*.» *Int J Med Microbiol*, 2001: 291: 331-43.

Cianciotto, NP. «Type II secretion: a protein secretion system for all seasons.» *Trends Microbiol*, 2005: 13: 581-588.

Ciesielski, CA, MJ Blaser, et WL Wang. «Serogroup specificity of *Legionella pneumphila* is related to lipoplysaccharide characteristics.» *Infect Immun*, 1986: 51:397-404.

Cirillo, SL, J Lum, et JD Cirillo. «Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*.» *Microbiology (Reading, Engl.)*, 2000: 146 (Pt 6): 1345-1359.

Cirillo, SL, LE Bermudez, SH El-Etr, GE Duhamel, et JD Cirillo. « *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence.» *Infect Immun*, 2001: 69: 508-517.

Cloud, JL, KC Carroll, P Pixton, M Erali, et DR Hillyard. «Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation.» *J Clin Microbiol.*, 2000: 38(5):1709-12.

Cohen, SP, Yan, W, et SB Levy. «A multidrug resistance regulatory chromosomal locus is widespread among enteric bacteria.» *J Infect Dis*, 1993: 168(2): 484-8.

Collins, MT, J McDonald, N Hoiby, et O Aalund. «Agglutinating antibody titers to members of the family *Legionellaceae* in cystic fibrosis patients as a result of crossreacting antibodies to *Pseudomonas aeruginosa*.» *J Clin Microbiol*, 1984: 19: 757-762.

Coscollá, M, C Fernández, J Colomina, Sánchez-Busó, L, et F González-Candelas. «Mixed infection by *Legionella pneumophila* in outbreak patients.» *Int J Med Microbiol*, 2013.

Crémet, L, N Caroff, Dauvergne S, Reynaud A, et D Lepelletier. «Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital.» *Pathol Biol (Paris)*, 2011: 59(3):151-6.

Cunha, BA. «Hypophosphatemia: diagnostic significance in Legionnaires'disease.» *Am J Med*, 2006: 119(7) : e5-6.

D'Auria, G, N Jimenez-Hernandez, F Peris-Bondia, A Moya, et A Latorre. « *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors.» *BMC Genomics*, 2010: 11:181.

de Felipe, KS, et al. «*Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking.» *PLoS Pathog*, 2008: 4: e1000117.

de la Campa, AG, C Ardanuy, L Balsalobre, E Pérez-Trallero, et Fenoll Marimón JM. «Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain.» *Emerg Infect Dis*, 2009: 15(6):905-11.

de Lassence, A, P Matsiota-Bernard, B Valtier, B Franc, F Jardin, et C Nauciel. «A case of myocarditis associated with legionnaires'disease.» *Clin Infect Dis*, 1994: 18(1) :120-1.

de Lau, LM, Da Siepman, MJ Remmers, GM Terwindt, et OQ Hintzen. «Acute disseminating encephalomyelitis following legionnaires disease .» *Arch Neurol*, 2010: 67(5) : 623-6.

De Vecchi, E, L Nicola, F Ossola, et L Drago. «In vitro selection of resistance in *Streptococcus pneumoniae* at in vivo fluoroquinolone concentrations.» *J Antimicrob Chemother*, 2009: 63(4):721-7.

Declerck, P. «Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*.» *Environ Microbiol*, 2010: 12: 557-566.

Decludt, B, et al. «Epidemic cluster of legionnaires disease in Paris, June 1998.» *Euro Surveill*, 1999: 4(11):115-118.

Deforges, L, et al. «Case of false-positive results of the urinary antigen test for *Legionella pneumophila*.» *Clin Infect Dis*, 1999: 29(4): 953-4.

Den Boer, J.W, et al. «Legionnaires' disease and gardening.» *Clin Microbiol Infect*, 2007: 13(1): 88-91.

Den Boer, J.W, et al. « Prediction of the origin of French *Legionella pneumophila* strains using a mixed-genome microarray.» *BMC Genomics,* 2013: 14: 435.

Dennis, PJ, D Green, et BP Jones. «A note on the temperature tolerance of *Legionella*.» *J App Bacteriol*, 1984: 56(2) : 349-50.

Dennis, PJ, et JV Lee. «Differences in aerosol survival between pathogenic and nonpathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1.» *J Appl Bacteriol*, 1988: 65: 135-141.

Diederen, BM. « *Legionella spp* and legionellaires'diseasase.» *J Infect*, 2008: 56(1): 1-12.

Diederen, BM, et al. «Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples.» *J Med Microbiol*, 2007: 56(Pt 1): 94-101.

Diederen, BM, et al. «Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity.» *J Med Microbiol*, 2007: 56(Pt 9): 1255.

Diederen, BMW, et MF Peeters. «Evaluation of two new immunochromatographic assays (Rapid U *Legionella* antigen test and SD Bioline Legionella antigen test) for detectionof *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine.» *J Clin Microbiol*, 2006: 44: 2991-2993.

Dietrich, C, K Heuner, BC, Hacker, J Brand, et M Steinert. «Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells.» *Infect Immun*, 2001: 69: 2116-2122.

Doebbeling, BN, MJ Bale, FP Koontz, CM Helms, RP Wenzel, et MA Pfaller. «Prospective evaluation of the Gen-Probe assay for detection of *Legionella* in respiratory specimens.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1988: 7(6):748-52.

Doleans-Jordheim, A, et al. «Growth-phase-dependent mobility of the lvh-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris.» *Microbiology (Reading, Engl)*, 2006: 152: 3561-3568.

Dominguez, JA, et al. «Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires' Disease.» *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2001: 41(4): 199-203.

Dominguez, JA, et al. «Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest Legionella Urin antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples.» *J Clin Microbiol*, 1998: 36(9): 2718-22.

Dorer, MS, D Kirton, JS Bader, et RR Isberg. «RNA interference analysis of *Legionella* in Drosophila cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics.» *PLoS Pathog*, 2006: 2: e34.

Dorman, CJ, et CP Corcoran. «Bacterial DNA topology and infectious disease.» *Nucleic Acids Res*, 2009: 37: 672-678.

Dorman, CJ, et P Deighan. «Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria.» *Curr Opin Genet Dev*, 2003: 13: 179-184.

Dowling, JN, AW Pasculle, FN Frola, MK Zaphyr, et RB Yee. «Infections caused by *Legionella micdadei* and *Legionella pneumophila* among renal transplant recipients.» *J Infect Dis*, 1984: 149(5): 703-13.

Dowling, JN, DA McDevitt, et AW Pasculle. «Isolation and preliminary characterization of erythromycin-resistant variants of *Legionella micdadei* and *Legionella pneumophila*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1985: 27(2):272-4.

Drlica, K, et X Zhao. «DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones.» *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997: 61: 377-392.

Drlica, K, H Hiasa, R Kerns, M Malik, A Mustaev, et X Zhao. «Quinolones: action and resistance updated.» *Curr Top Med Chem*, 2009: 9: 981-998 .

Drozanski, WJ. «*Sarcobium lyticum* gen. nov. , sp. nov., an obligate intracellular bacterial parasite of small free-living amoebae.» *Int J Syst Bacteriol*, 1991: 41 : 82-7.

Dubois, J, et C St-Pierre. «Comparative in vitro activity and post-antibiotic effect of gemifloxacin against *Legionella spp*.» *J Antimicrob Chemother*, 2000: 45 Suppl 1: 41-6.

Dubois, J, et C St-Pierre. «In vitro activity of gatifloxacin, compared with ciprofloxacin, clarithromycin, erythromycin, and rifampin, against *Legionella* species.» *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999: 33(4):261-5.

Eaves, DJ, et al. «Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2004: 48(10).

Ecker, DJ, R Sampath, P Willett, et JR Wyatt. «The Microbial Rosetta Stone Database: A compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents.» *BMC Microbiology*, 2005: 5: 19.

Edelstein, PH. « Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens.» *J Clin Microbiol*, 1981: 14(3): 298–303.

Edelstein, PH. «Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: time for a change.» *Ann Intern Med*, 1998: 129(4): 328-30.

Edelstein, PH. «Review of azithromycin activity against *Legionella spp*.» *Pathol Biol (Paris)*, 1995: 43(6): 569-72.

Edelstein, PH, et RD Meyer. «Susceptibility of *Legionella pneumophila* to twenty antimicrobial agents.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1980: 18(3): 403-8.

Edelstein, PH, et WJ., Edelstein, MA Weiss. «Activities of tigecycline (GAR-936) against *Legionella pneumophila* in vitro and in guinea pigs with *L. pneumophila* pneumonia.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2003: 47(2): 533-40.

Edelstein, PH, JB Snitzer, et JA Bridge. «Enhancement of recovery of *Legionella pneumophila* from contaminated respiratory tract specimens by heat.» *J Clin Microbiol*, 1982: 16(6): 1061-5.

Edelstein, PH, K Calarco, et VK Yasui. «Antimicrobial therapy of experimentally induced Legionnaires' disease in guinea pigs.» *Am Rev Respir Dis*, 1984: 130(5):849-56.

Edelstein, PH, T Shinzato, E Doyle, et MA Edelstein. «In vitro activity of gemifloxacin (SB-265805, LB20304a) against *Legionella pneumophila* and its pharmacokinetics in guinea pigs with *L. pneumophila* pneumonia.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2001: 45(8):2204.

Edlestein, PH, KB Beer, JC Struge, AJ Watson, et LC Goldestein. «Clinical utility of a monoclonal direct fluorescent reagent specific for *Legionella pneumophila* : comparative studywith other reagents.» *J Clin Microbiol*, 1985: 22(3) : 419-21.

Edlestein, PH, RD Meyer, et SM Finegold. «Laboratory diagnosis of legionnaires 'disease .» *Am Rev Respir Dis*, 1980: 121(2) : 317-27.

el-Ebiary, M, et al. «Prognostics factors of severe *Legionella pneumonia* requiring admission to ICU.» *Am J Respir Crit Care Med*, 1997: 156(5) : 1467-72.

Eriksson, PR, et al. «Global regulation by the yeast Spt10 protein is mediated through chromatin structure and the histone upstream activating sequence elements.» *Mol Cell Biol*, 2005: 25: 9127-9137.

Espeli, O, et KJ Marians. «Untangling intracellular DNA topology.» *Mol Microbio*, 2004: 52: 925-931.

Everett, MJ, YF Jin, V Ricci, et L Piddock. «Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals.» *JAntimicrob Agents Chemother*, 1996: 40(10):2380-6.

Falcó V1, Molina I, Juste, C, et al. «[Treatment for Legionnaires' disease. Macrolides or quinolones?].» *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2006: 24(6):360-4.

Falguera, M, et al. «Nonsevere community-acquired pneumonia: correlation between cause and severity or comorbidity.» *Arch Intern Med*, 2001: 161(15): 1866-72.

Faulkner, G, et R A Garduño. «Ultrastructural Analysis of Differentiation in *Legionella pneumophila*.» *J Bacteriol*, 2002: 184:7025-7041.

Feddersen, A, Heinz-Georg W Meyer, P Matthes, S Bhakdi, et M Husmann. «GyrA sequence-based typing for Legionella.» *Medical Microbiology and Immunology*, 2000: 189(1): 7-11.

Feeley, JC, et al. «Charcol-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*.» *J Clin Microbiol*, 1979: 10: 437-441.

Felmingham, D, MJ Robbins, M Sanghrajka, A Leakey, et GL Ridgway. «The in vitro activity of some 14-, 15- and 16- membered macrolides against *Staphylococcus spp*., *Legionella spp*., *Mycoplasma spp*. and *Ureaplasma urealyticum*.» *Drugs Exp Clin Res*, 1991: 7(2):91-9.

Fendukly, F, et al. «Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin.» *Apmis*, 2003: 111(9): 857-66.

Fenstersheib, MD, et al. «Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*.» *Lancet*, 1990: 336: 35-37.

Fernandez, JA, P Lopez, D Orozco, et J Merino. «Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002: 21: 729-735.

Fernandez-Sabe, N, et al. «Clinical diagnosis of *Legionella pneumonia* revisited: evaluation of the Community-Based Pneumonia Incidence Study Group scoring system.» *Clin Infect Dis*, 2003: 37(4): 483-9.

Ferrandiz, M, Martin-Galiano AJ, JB Schvartzman, et AG de la Campa. « The genome of *Streptococcus pneumoniae* is organized in topology-reacting gene clusters.» *1ucleic Acids Res*, 2010: Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate1.inist.fr/pubmed/20176571.

Ferrero, L, B Cameron, et J Crouzet. «Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus.» Antimicrob Agents Chemother*, 1995: 39(7): 1554-8.

Fields, BS, RF Benson, et RE Besser. «*Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation.» *Clin Microbiol Rev*, 2002: 15(3): 506–526.

Fine, MJ, TE Auble, DM Yealy, et al. «A prediction rule to identify low risk patients with community-acquired pneumonia.» *N Engl J Med*, 1997: 336: 243–250.

Fitzgeorge, RB, AS Featherstone, et A Baskerville. «The effect of ofloxacin on the intracellular growth of *Legionella pneumophila* in guinea pig alveolar phagocytes.» *J Antimicrob Chemother*, 1988: 22 Suppl C:53-7.

Flendrie, M, Jeurissen M, Franssen M, D kwa, C Klaassen, et F Vos. «Septic arthritis caused by *Legionella dumoffii* in a patient with systelmic lupus erythematosus –like disease.» *J Clin Microbiol* 49(2) : 746-9.

Fliermans, CB. «Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom.» *Microb Ecol*, 1996: 32: 203-228.

Forsbach-Birk, V, T McNealy, C Shi, D Lynch, et R Marre. «Reduced expression of the global regulator protein CsrA in *Legionella pneumophila* affects virulence-associated regulators and growth in *Acanthamoeba castellanii*.» *Int J Med Microbiol*, 2004: 294: 15-25.

Fournier, B, et A Klier. «Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the Ar1S-Ar1R two-component of *staphylococcus aureus*.» *Microbiology (reading, engl)*, 2004: 150: 3807-3819.

Fox, A, JC, Fox, KF Rogers, G Schneitzer, SL Morgan, A Brown, et al. «Chemotaxonomic differtiation of legionellae by detection and characterization of aminodide-doxyhexoses ans otrhr unique sugars gas chromatography-mass spectrometry.» *J Clin Microbiol*, 1990: 28: 546-52.

Fox, A, PY lau, A Brown, SL Morgan, ZI Zhu, et M Lema. «cabillary gas chromatographic analysis of carbohydrates of *Legionella pneumophila* and members of the family legionellaceae.» *J Clin Microbiol*, 1984: 19: 326-32.

Franco, IS, HA Shuman, et X Charpentier. « The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors.» *Cell Microbiol*, 2009: 11: 1435-1443.

Franzin, L, et F Scramuzza. «Prevalence of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antibodies in blood donors.» *Eur J Epidemiol*, 1995: 11(4):475-8.

Fraser, DW. «The challenges were legion.» *Lancet Infectious Dis*, 2005: 5(4) :237-41.

Fraser, DW, et al. «Legionnaires' Disease — Description of an Epidemic of Pneumonia.» *N Engl Med*, 1977: 1189-1197.

Friedman, SM, et al. «Pontiac fever outbreak associated with a cooling tower.» *Am J Public Health*, 1987: 77(5): 568-72.

Friedman, SM, T Lu, et K Drlica. «Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2001: 45(8): 2378-80.

Gacouin, a, et al. «sever pneumonia due to *Legionella pneumophila* : prognostic facteurs, impact of delayed appropriate antimicrobial therapy.» *Intensiv Care Med*, 2002: 28(6) : 686-91.

Gal-Mor, O, et G Segal. « Identification of CpxR as a positive regulator of icm and dot virulence genes of *Legionella pneumophila*.» *J Bacteriol*, 2003: 185:4908-4919.

Gao, LY, BJ Stone, JK Brieland, et Y Abu Kwaik. «Different fates of *Legionella pneumophila* pmi and mil mutants within macrophages and alveolar epithelial cells.» *Microb Pathog*, 1998: 25: 291-306.

Gao, LY, et Y Abu Kwaik. «Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity.» *Infect Immun*, 1999: 67: 862-870.

Gao, LY, et Y Abu Kwaik. «The mechanism of killing and exiting the protozoan host Acanthamoeba polyphaga by *Legionella pneumophila*.» *Environ Microbiol*, 2000: 2: 79-90.

Garcia, M.T, et al. «In vitro activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test results.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2000: 44(8) : 2176-8.

Garduno, RA, E Garduno, et PS Hoffman. «Surface associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model.» *Infect Immun*, 1998: 66: 4602-4610.

Garrity, GM, Julia A Bell, et Timothy Lilburn. «Legionellales ord. nov.» *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 2005: pp 210-247.

Garrity, GM, A Brown, et M Vickers. «*Tatlockia* and *Fluoribacter*: Two New Genera of Organisms Resembling *Legionella pneumophila*.» *Int J Sys Evol Microbiol*, 1990: 30(4): 609-614.

Gellert, M, MH O'Dea, T Itoh, et J Tomizawa. «Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase.» *Proc 1atl Acad Sci U.S.A*, 1976: 73: 4474-4478.

Giraud, E, S Baucheron, et A Cloeckaert. «Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella:* emerging mechanisms and resistance prevention strategies.» *Microbes Infect*, 2006: 8(7): 1937-44.

Glick, TH, MB Gregg, B Berman, G Mallison, WW Rhodes, et I Kassanoff. «Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical andepidemiologic aspects.» *Am J Epidemiol*, 1978: 107: 149-160.

Glockner, G, et al. « Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands.» *Int J Med microbiol*, 2008: 298: 411-428F.

Gmuender, H, K Kuratli, K Di Padova, CP Gray, W Keck, et S Evers. «Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis.» *Genome Res*, 2001: 11: 28-42.

Goldberg, DJ, et al. «Lochgoilhead fever: outbreak of non-pneumonic legionellosis due to *Legionella micdadei*.» *Lancet*, 1989: 1: 316-318.

Goldstein, E, et K Drlica. «Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature.» *Proc 1atl Acad Sci U.S.A*, 1984: 81: 4046-4050.

Gomez-Valero, L, C Rusniok, et C Buchrieser. « *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics.» *Infection Genetics and Evolution*, 2009: 9: 727-739.

Grau, S, et al. «Impact of rifampicin addition to clarithromycin in *Legionella pneumophila* pneumonia.» *Int J Antimicrob Agents*, 2006: 28(3): 249-52.

Graves, PW. «New methods for the isolation of *Legionella pneumophila*.» *J Clin Pathol*, 1980: 33(6) : 581-4.

Green, M, ER Wald, B Dashefsky, K Barbadora, et RM Wadowsky. «Field inversion gel electrophoresis analysis of *Legionella pneumophila* strains associatedwith nosocomial lagionellosisin children.» *J Clin Microbiol*, 1996: 34(1) : 175-6.

Griffin, AT, P Peyrani, T Wiemken, et F Arnold. «Macrolides versus quinolones in Legionella pneumonia: results from the Community-Acquired Pneumonia, Organization international study.» *Int. J. Tuberc. Lung Dis*, 2010: 14: 495-499.

Guerrero, C, CM Toldos, G Yague, C Ramirez, T Rodriguez, et M Segovia. «Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup1 antigen urinaire.» *J Clin Microbiol*, 2004: 42: 467-468.

Guillemin, I, E Cambau, et V Jarlier. «Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus mycobacterium: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones.» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995: 39(9): 2145-2149.

Hales, L.M, et H.A Shuman. «The *Legionella pneumophila* rpoS gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*.» *J bacteriol*, 1999: 181: 4879-4889.

Hallett, P, et A Maxwell. «Novel quinolone resistance mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1991: 35(2): 335-40.

Han, JH, JC Nguyen, S Harada, LM Baddour, et PH Edelstein. «Relapsing *Legionella pneumophila* cellulitis: a case report and review of the literature.» *J Infect Chemother*, 2010: 16(6):439-42.

Haranaga, S, et al. «Intravenous ciprofloxacin versus erythromycin in the treatment of *Legionella pneumonia*.» *Intern Med*, 2007: 46(7):353-7.

Harb, OS, et Y Abu Kwaik. «Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (*milA*) of *Legionella pneumophila*.» *Infect Immun*, 2000: 68: 368-376.

Hardy, CD, et NR Cozzarelli. «A genetic selection for supercoiling mutants of, *Escherichia coli* reveals proteins implicated in chromosome structure.» *Mol Microbiol*, 2005: 57: 1636-1652.

Harrison, TG, et Taylor AG. «A rapid microagglutination test for the diagnosis of *Legionella pneumophila* (serogroupe 1) infection.» *J Clin Path*, 1982: 35(9) : 1028-3.

Harrison, CF, et al. « Exploring anti-bacterial compounds against intracellular *Legionella*.» *PLoS One.*, 2013: 8(9) : e74813-3.

Hartigan, DA. «Comparison of specific immunoglobulin G, M and agglutinating antibodies against *Legionella pneumophila*.» *Scand J Infect Dis*, 1981: 13(4):269-72.

Havlichek, D, D Pohlod, et L Saravolatz. «Comparison of ciprofloxacin and rifampicin in experimental *Legionella pneumophila* pneumonia.» *J Antimicrob Chemother*, 1987: 20(6):875-81.

Hawkey, PM. «Mechanisms of quinolone action and microbial response.» *J Antimicrob Chemother*, 2003: 51 Suppl 1: p. 29-35.

Hawn, TR, A Verbon, KD Lettinga, LP Zhao, SS Li, et RJ et al Laws. «acommon domainant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associted with susceptiblility to legionnaires(disease.» *J Exp Med*, 2003: 198(10) : 1563-72.

Hawn, TR, KD Smith, A Aderem, et SJ Skerrett. «Myloid Differentiation Primary Response Gene (88)- and Toll-Like Receptor 2-Deficient Mice Are Susceptibeto Infection with Aerosolized *Legionella pneumophila*.» *J Infect Dis*, 2006: 93(12): 1693-702.

Hayden, RT, et al. «direct detection of *Legionella* spices from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorecenceantigen direction , and culture .» *J Clin Microbiol*, 2001: 39(7) : 2618-26.

Heaton,VJ, JE Ambler, et LM Fisher. «Potent antipneumococcal activity of gemifloxacin is associated with dual targeting of gyrase and topoisomerase IV, an in vivo target preference for gyrase, and enhanced stabilization of cleavable complexes in vitro.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2000: 44(11):3112-7.

Hebert, GA. «Room température storage of *Legionella* cultures.» *J Clin Microbiol*, 1980: 12(6) :807-9.

Heidtman, M, EJ Chen, M Moy, et RR Isberg. «Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways.» *Cell Microbiol*, 2009: 11: 230-248.

Heisig, P. «(Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1996: 40(4):879-85.

Heisig, P, et al. «Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany.» *Microb Drug Resist*, 1995: 1(3):211-8.

Helbig, JH, et al. «Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease.» *J Clin Microbiol*, 2003: 41(2): 38-40.

Helbig, JH, et al. «Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of Legionella pneumphila serogroups and monoclonal subgroups.» *Eur J Clin Microbiol Infect*, 2002: 21:710-716.

Helbig, JH, et al. «Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella

Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA.» *J Med Microbiol*, 2001: 50(6): 509-16.

Helbig, JH, PC Luck, YA Knirel, W Witzleb, et U Zahringer. «Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1.» *Epidemiol. Infect* , 1995: 115: 71-78.

Helms, CM, ED Renner, JP Viner, WJ Jr Hierholzer, LA Wintermeyer, et W Johnson. «Indirect immunofluorescence antibodies to *Legionella pneumophila*: frequency in a rural community.» *J Clin Microbiol*, 1980: 12(3):326-8.

Helms, CM, W Johnson, ED Renner, Hierholzer WJ Jr, LA Wintermeyer, et JP Viner. «Background prevalence of microagglutination antibodies to *Legionella pneumophila* serogroups 1, 2, 3, and 4.» *Infect Immun*, 1980: 30(2):612-4.

Herpers, BL, BM de Jongh, K van der Zwaluw, et EJ van Hannen. «Real-time PCR assay targets the 23S-5s speacer for direct detection and differanciation of *Legionella spp*. and *Legionella pneumophila*.» *J Clin microiol*, 2003: 41(10) :4815-6.

Herwaldt, LA, et al. «A new *Legionella* species, *Legionella feeleii* species nova, causes Pontiac fever in an automobile plant.» *Ann Intern Med*, 1984: 100: 333-338.

Heuner, K, et M Steinert. «The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype.» *Int J Med Microbiol*, 2003: 293: 133-143.

Hiasa, H, et KJ Marians. «Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication.» *J Biol chem*, 1996: 271: 21529-21535.

Hickey, EK, et NP Cianciotto. «An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases.» *Infect Immun*, 1997: 65: 133-143.

Higa, F, et al. «Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular *Legionella pneumophila*.» *J Clin Microbiol*, 1998: 36(5):1392-8.

Higgins, CF, CJ, Stirling, DA Dorman, L Waddell, IR Booth, G May, et E Bremer. «A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in S. typhimurium and *E. coli*.» *Cell*, 1988: 52: 569-584.

Hirai, K, et al. «Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1986: 29(3): 535-8.

Hoffman, PS, JH Seyer, et CA Bulter. «Molecular characterization of the 28- and 31-kilodalton subunits of the *Legionella pneumophila* major outer membrane protein.» *J Bacteriol*, 1992: 174(3): 908-13.

Hoge, CW, et RF Breiman. «Advances in the epidemiology and control of *Legionella* infections.» *Epidemiol Rev*, 1991: 13: 329-40.

Hookey, JV, NA, Fry, NK Saunders, RJ Birtles, et TG Harrison. «Phylogeny of legionellaceae based on small_subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella-like amoebal pathogens*.» *Int J Syst Bacteriol*, 1996: 46: 526-31.

Hopkins, KL, RH Davies, et EJ Threlfall. « Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments.» *Int J Antimicrob Agents*, 2005: 25(5): 358-73.

Horwitz, MA. « The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes.» *J exp Med*, 1983: 158: 2108-2126.

Husman, M, A Feddersen, A steitz, C freytag, et S bhakdi. «Simultaneous identification of *campylobacters* and prediction of quinolone resistance by comparative sequence analysis.» *J Clin Microbiol*, 1997: 35(9): 2398-2400.

Ince, D, et DC Hooper. «Mechanisms and frequency of resistance to gatifloxacin in comparison to AM-1121 and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2001: 45(10): 2755-64.

Ingram, JG, et JF Plouffe. «Danger of sputum purulence screens in culture of *Legionlla* spices.» *J Clin Microbiol*, 1994: 32(1) : 209-10.

Isberg, RR, TJ O'Connor, et M Heidtman. «The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells.» *Nat Rev Microbiol*, 2009: 7:13-24.

Ito, H, et al. «Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1994: 38(9): 2014-23.

Jacoby, G, et al. «*qnr* Gene nomenclature.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2008: 52(7):2297-9.

Jacoby, GA. «Mechanisms of resistance to quinolones.» *Clin Infect Dis*, 2005: 41 Suppl. 2:120-126.

Jantzen, E, et K Bryn. «analyses of cellularconstituents from gram-negative bacteria.» *Goodfellow, M; O'Donnell, A.G; Modern Microbiological Methods; Chemical Methods In Prokaryotic Systematics*, 1994: 21-61.

Jarraud, S, et J Freney. *Legionella.* Lyon: LAVOISIER, 2012.

Jaulhac, B, et al. «Detection of *Legionella spp*. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification.» *J Clin Microbiol*, 1992: 30(4):920-4.

Jespersen, S, OS Sogaard, HC Schonheyder, HJ Fine, et L Ostergaard. «Clinincal features and predictors of mortality in admitted patient with commiunity- and hospital-acquired legionellosis: a Danich historical cohort study.» *BMC Infect Dis*, 2010: 10: 124.

Jespersen, S, OS Sogaard, HC Schonheyder, MJ Fine, et L Ostergaard. «Clinincal features and predictors of mortality in admitted patient with commiunity- and hospital-acquired legionellosis: a Danich historical cohort study.» *BMC Infect Dis*, 2010: 10: 124.

Jonas, D, et al. «Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *legionellae* in bronchoalveolar fluid.» *J Clin Microbiol*, 1995: 33(5): 1247-52.

Jones, TF, RF Benson, EW Brown, JR Rowland, SC Crosier, et W Schaffner. «Epidemiologic investigation of a restaurant-associated outbreak of Pontiac fever.» *Clin Infect Dis*, 2003: 37(10):1292-7.

Joseph CA, Ricketts KD. «From development to success: the European surveillance scheme for travel associated Legionnaires' disease.» *Eur J Public Health*, 2007: 17(6):652-6.

Joseph, CA, et M van der Sande. «Unexplained summer increase in non-travel-related legionellosis in the UK and Netherlands.» *Euro Surveill*, 2006: 11(10): E061018 1.

Jovanovich, SB, et J Lebowitz. «Estimation of the effect of coumermycin A1 on *Salmonella typhimurium* promoters by using random operon fusion.» *J. bacteriol*, 1987: 169: 4431-4435.

Jung, R., L.H. Danziger, and S.L. Pendland. « Intracellular activity of ABT-773 and other antimicrobial agents against *Legionella pneumophila*.» *J Antimicrob Chemother*, 2002: 49(5): 857-61.

Kagan, JC, M Stein, M Pypaert, et CR Roy. «Legionella subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle.» *J. Exp. Med*, 2004: 199: 1201-1211.

Kakeya, H, et al. «Severe Legionnaires' disease successfully treated using a combination of fluoroquinolone, erythromycin, corticosteroid, and sivelestat.» *Intern Med*, 2008: 47(8):773-7.

Kallings, I, et K Nordstrom. «The pattern of immunoglobulins with special reference to IgM in Legionnaires' disease patients during a 2 year follow-up period.» *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 1983: 255(1): 27-32.

Kar, S, R Edgar, et S Adhya. «Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program.» *Proc. 1atl. Acad. Sci. U.S.A*, 2005: 102: 16397-16402.

Karem, K, et JW Foster. «The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in Salmonella typhimurium.» *Mol. Microbiol*, 1993: 10: 75-86.

Kashimoto, Y, et al. «Therapeutic efficacy of levofluoxacin against a model of replicable *Legionella pneumophila* lung infection in DBA/2 mice.» *Jpn J Antibiot*, 2009: 62(5): 452-9.

Kashuba, AD, Ballow, et CH. «Legionella urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy.» *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 1996: 24: 129-139.

Kaufmann, AF, et al. «Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (Legionella pneumophilia) and demonstration of its mode oftransmission.» *Am. J. Epidemiol*, 1981: 114: 337-347.

Kazandjian, D, R Chiew, et GL Gilbert. «Rapid diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test.» *J Clin Microbiol*, 1997: 35(4):954-6.

Keane, OM, et CJ Dorman. «The gyr genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by the factor for inversion stimulation.» *Fis. Mol. Genet. Genomics* , 2003: 270:56-65.

Kelly, A, MD Goldberg, RK Carroll, V Danino, JCD Hinton, et CJ Dorman. «A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.» *Microbiology (Reading, Engl)*, 2004: 150: 2037-2053.

Kessler, HH, et al. «Rapid detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavage fluids with the EnviroAmp Legionella PCR amplification and detection kit.» *J Clin Microbiol*, 1993: 31(12):3325-8.

Khodursky, AB, EL Zechiedrich, et NR Cozzarelli. «Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995: 92(25):11801-5.

Kim, MJ, JW Sohn, DW Park, SC Park, et BC Chun. «Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease.» *J Clin Microbiol*, 2003: 41: 2974-2979.

Klein, CG, WL Jones, et JC Feeley. «Upper limit of normal titer for detection of antibodies to *Legionella pneumophila* by the microagglutination test.» *J Clin Microbiol*, 1979: 10(5): 754-5.

Klein, GC. «Cross-reaction to *Legionella pneumophila* antigen in sera with elevated titers to *Pseudomonas pseudomallei*.» *J Clin Microbiol*, 1980: 11(1):27-9.

Knaus, WA, EA Draper, DP Wagner, et JE Zimmerman. «APACHE II: a severity of disease classification system.» *Critical Care Medicine*, 1985: 13 (10): 818–29.

Kohler, R, et al. «Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*.» *Infect Immun*, 2003: 71: 4389-4397.

Kohler, RB, et al. «Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease: detection and partialcharacterization of urinary antigen.» *Ann Intern Med*, 1981: 94: 601-605.

Kohler, RB, WC Winn, Wheat, et LJ. «Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease.» *J Clin Microbiol*, 1984: 20: 605-607.

Koide, M, et A Saito. «Diagnosis of *Legionella pneumophila* infection by polymerase chain reaction.» *Clin Infect Dis*, 1995: 21(1):199-201.

Koide, M, F Higa, M Tateyama, H Sakugawa, et A Saito. «Comparison of polymerase chain reaction and two urinary antigen detection kits for detecting *Legionella* in clinical samples.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004: 23(3):221-3.

Koide, M, F Higa, M Tateyama, I Nakasone, N Yamane, et J Fujita. «Detection of *Legionella* species in clinical samples: Comparison of polymerase chain reaction and urinary antigen detection kits.» *Infection*, 2006: 34(5):264-8.

Koide, M, F Higa, M Tateyama, H Sakugawa, et A Saito. «Comparison of polymerase chain reaction and two urinary antigen detection kits for detecting *Legionella* in clinical samples.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004: 23(3):221-3.

Komp Lindgren, P, A Karlsson, et D Hughes. «Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2003: 47(10): 3222-32.

Kooistra, O, E Luneberg, B Lindner, YA Knirel, M Frosch, et U Zahringer. «Complex Oacetylation in *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Evidence for two genes involved in 8-O-acetylation of legionaminic acid.» *Biochemistry*, 2001: 40: 7630-7640.

Kozak, NA, et al. «Virulence factors encoded by Legionella longbeachae identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968.» *J Bacteriol*, 2010: 192: 1030-1044.

Kozak, NA, RF Benson, E, Alexander, NT Brown, et al. «Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States.» *J Clin Microbiol*, 2009: 47: 2525-2535.

Kozak, NA, CE Lucas, E Brown, T Pondo, TH Taylor, M Frace, D Miskowski, JM Winchell . « Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012.» *J Clin Microbiol*, 2014: 52(1): 201-11.

Krinos, C, AS High, et FG Rodgers. «Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos.» *J Appl Microbiol*, 1999: 86: 237-244.

Kubori, T, A Hyakutake, et H Nagai. «*Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions.» *Mol Microbiol*, 2008: 67: 1307-1319.

Kumagai, Y, JI Kato, K Hoshino, T Akasaka, K Sato, et H Ikeda. «Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1996: 40(3):710-14.

Kunishima, H, et al. «Evaluation of the activity of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila* multiplying in a human monocytic cell line, THP-1, and an alveolar epithelial cell line, A549.» *J Infect Chemother*, 2000: 6(4):206-10.

Kurz, R.W, et al. «Failure of treatment of *Legionella pneumonia* with ciprofloxacin.» *J Antimicrob Chemother*, 1988: 22(3): 389-91.

La Scola, B, L Mezi, PJ Weiller, et D Raoult. «Isolation of *Legionella anisa* Using an Amoebic Coculture Procedure.» *J Clin Microbiol*, 2001: 39(1): 365–366.

La Scola, B, RJ Birtles, G Greub, TJ Harrison, RM Ratcliff, et D raoult. «*Legionella drancourtii* sp.nov., a strictly intracellular amoebal pathogen.» *Int Syst Evol Microbiol*, 2004: 54(pt3) : 699-703.

Laferl, H, et al. «Murine typhus poorly responsive to ciprofloxacin: a case report.» *J Travel Med*, 2002: 9(2): 103-4.

Laguna, RK, EA Creasey, Z Li, N Valtz, et RR Isberg. «A *Legionella pneumophila* translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death.» *Proc 1atl Acad Sci U.S.A*, 2006: 103: 18745-18750.

Lammertyn, E, et J Anné. «Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence.» *FEMS Microbio. Lett*, 2004: 238: 273-279.

Laussucq, S, D Schuster, WJ Alexander, WL Thacker, HW Wilkinson, et JS Spika. «False-positive DNA probe test for *Legionella* species associated with a cluster of respiratory illnesses.» *J Clin Microbiol*, 1988: 26(8):1442-4.

Lee, YJ, et al. «Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken.» *J Microbiol*, 2005: 43(5):391-7.

Lema, M.W, et A Brown. « *Legionella pneumophila* has two 60-kilodalton heat-shock proteins.» *Curr Microbiol*, 1995: 31(6): p. 332-5.

Leoni, E, et PP Legnani. «Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems.» *J Appl Microbiol*, 2001: 90(1):27-33.

Lesher, GJ, EJ Froelich, MD Gruett, JH Bailey, et RP Brundage. «1,8-naphthyridine derivatives. a new class of chemotherapeutic agents.» *J Med Pharm Chem*, 1962: 91:1063-5.

Lettinga, KD, A Verbon, PT Nieukerk, BP Jersons, JM Prins, et al. «Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder among survivors of an outbreack of Legionnaires'disease .» *Clin Infection Dis*, 2002: 35(1):11-7.

Lever F, Joseph CA, et European Working Group for Legionella Infections. «Travel associated legionnaires' disease in Europe in 2000 and 2001.» *Euro Surveill*, 2003: 8(3):65-72.

Leverstein-van Hall, MA, A Verbon, MV Huisman, EJ Kuijper, et J Dankert. «Reinfection with *Legionella pneumophila* documented by pulsed-field gel electrophoresis.» *Clin Infect Dis*, 1994: 19(6): 1147-9.

Levine, C, H Hiasa, et KJ Marians. «DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities.» *Biochim Biophys Acta*, 1998: 1400: 29-43.

Li, X, et al. «Quinolone-resistant *Haemophilus influenzae* in a long-term-care facility: nucleotide sequence characterization of alterations in the genes encoding DNA gyrase and DNA topoisomerase IV.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2004: 48(9): 3570-2.

Liebers, DM, AL Baltch, RP Smith, MC Hammer, et JV Conroy. «Susceptibility of *Legionella pneumophila* to eight antimicrobial agents including four macrolides under different assay conditions.» *J Antimicrob Chemother*, 1989: 23(1):37-41.

Lifshitz Z, D Burstein, M Peeri, T Zusman, K Schwartz, HA Shuman, T pupko, G Segal. « Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013: 110(8): E707-15.

Liles, MR, TA Scheel, et NP Cianciotto. « Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*.» *J Bacteriol*, 2000: 182: 749-757.

Lindback, E., et al. « Mutations in *gyrA, gyrB, parC*, and *parE* in quinolone-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*.» *Apmis*, 2002: 110(9): 651-7.

Lindsay, DS, WH Abraham, W Findlay, B Christi, F Johnston, et GF Edwadrs. «laboratory diagnosis of legionnaires'diseasedue to *Legionella pneumophila*serogroupe 1 : comparison of phenotypic and genotypic methods.» *J Med Microbiol*, 2004: 53(Pt 5) : 183-7.

Lindstedt, BA, L Aas, et G Kapperud. «Geographically dependent distribution of *gyrA* gene mutations at codons 83 and 87 in Salmonella Hadar, and a novel codon 81 Gly to His mutation in *Salmonella Enteritidis*.» *APMIS*, 2004: 112(3):165-71.

Ling, JM, et al. «Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant salmonellae in Hong Kong.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2003: 47(11): 3567-73.

luck, CP, E Jacobs, I Roske, U Schroter-Bobsin, R Dumke, et S Grovow. « *Legionella drestenensis* sp.nov.isolatedrom the river Elbe near Dresden in Germany.» *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009: 11.

Luijsterburg, MS, MC Noom, GJL Wuite, et RT Dame. «The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecularperspective.» *J Struct Biol*, 2006: 156: 262-272.

Lurie-Weinberger, MN, L Gomez-Valero, N Merault, G Glockner, C Buchrieser, et U Gophna. «The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*.» *Int J Med*, 2010.

Lüttichau, HR, C Vinther, SA Uldum, J Møller, M Faber, et JS Jensen. «An outbreak of Pontiac fever among children following use of a whirlpool.» *Clin Infect Dis*, 1998: 26(6):1374-8.

Lynch, D, N Fieser, K Glöggler, V Forsbach-Birk, et R Marre. «The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellani*.» *FEMS Microbiol*, 2003: Lett 219: 241-248.

Magnet, S, P Courvalin, et T Lambert. «Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2001: 45(12): 3375-80.

Malhotra-Kumar, S, L Van Heirstraeten, et Lamme. «Emergence of high-level fluoroquinolone resistance in emm6 *Streptococcus pyogenes* and in vitro resistance selection with ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin.» *J Antimicrob Chemother*, 2009: 63(5):886-94.

Mallegol J, P Fernandes, RG Melano, C Guyard. « Antimicrobial activity of solithromycin against clinical isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1..» *Antimicrob Agents Chemother*, 2014: 58(2): 909-15.

Mangan, MW, S Lucchini, V Danino, TO Croinin, JCD Hinton, et CJ Dorman. « The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.» *Mol Microbiol*, 2006: 59: 1831-1847.

Marra, A, SJ Blander, MA Horwitz, et HA Shuman. «Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages.» *proc. 1atl acad sci U.S.A*, 1992: 89: 9607-9611.

Martínez, José L. «Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments.» *Science*, 2008: 321 (5887): 365-367.

Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. «Quinolone resistance from a transférable plasmide.» *Lancet*, 1998: 351(9105):797-9.

Matsiota-Bernard, P, D Thierry, JL Guesdon, et C Nauciel. «Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by ribotyping with a non-radioactive probe and PCR fingerprinting.» *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1994: 9(1):23-7.

Matsiota-Bernard, P, S Waser, et G Vrioni. «detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia .» *Clin Infect Dis*, 2000: 6(4) : 223-5.

Matthews, M, et CR Roy. «Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells.» *Infect Immun*, 2000: 68: 3971-3982.

Mauchline, WS, R Araujo, R wait, AB Dowsett, JP Dennis, et Keevil CW. «Physiology and morphology of *Legionella pneumophila* in continuous culture at low oxygen concentration.» *J gen Microbiol*, 1992: 138(11): 2371-80.

Maurin, M, et al. «Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis.» *Clin Microbiol Infect*, 2010: 16(4):379-84.

Maurin, M, et Raoult D. «Q fever.» *Clin Microbiol Rev*, 1999: 12(4): 518-53.

McConkey, J, M Obeius, J Valentini, et MS Beeson. «*Legionella pneumonia* presenting with rhabdomyolysis and acute renal failure: a case report.» *J Emerg Med*, 2006: 30: 389-392.

McDade, JE. «Legionnaires' disease 25 years after: lessons learned.» *In : Marre R, (ed.), Legionella. ASM Press, Washington*, 2002: 444.

McDade, JE, CC Shepard, DW Fraser, TR Tsai, MA Redus, et WR Dowdle. «Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease.» *1 Engl J Med*, 1977: 297: 1197-1203.

McDade, JE, DJ Brenner, et FM Bozeman. «Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947.» *Ann Intern Med*, 1979: 90: 659-661.

McDonald, LC, et al. «Emergence of reduced susceptibility and resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and contributions of distinct selective pressures.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2001: 45(11): 3084-91.

Megarbane, B, S Montambault, I Chary, M Guibert, O Axler, et FG Brivet. «Acute,pancreatitis caused by severe *Legionella pneumophila* infection.» *Infection*, 2000: 28: 329-331.

Mérault N, C Rusniok, S Jarraud, L Gomez-Valero, C Cazalet, M Maurin, E Brachet, P Aegerter, JL Gaillard, J Etienne, JL Herrmann; the DELPH-I group, C Lawrence, C Buchrieser. «A specific real-time PCR for simultaneous détection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples.» *Appl Environ Microbiol*, 2011:77:1708-17.

Merex, S, W Zimmer, M Neumaire, et P Ahmad-Nejad. «Characterization and functional intvestigation of single nucleotide polymorfisme (SNPs) in the human TLR5 gene.» *Hum Mutat*, 2006: 27(3): 293.

Merriam, JJ, R Mathur, R Maxfield-Boumil, et RR Isberg. «Analysis of the *Legionella pneumophila* fliI gene: intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis.» *Infect Immun*, 1997: 65: 2497-2501.

Miller, LA, et al. «Use of polymerase chain reaction in an epidemiologic investigation of Pontiac fever.» *J Infect Dis*, 1993: 168(3):769-72.

Mintz, CS, DR Schultz, PI Arnold, et W Johnson. « *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway.» *Infect Immun*, 1992: 60 : 2769-2776.

Mintz, CS, JX Chen, et HA Shuman. «Isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Legionella pneumophila* that fail to multiply in human monocytes.» *Infect Immun*, 1988: 56: 1449-1455.

Mitsuyama, J, et al. «In vitro antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1992: 36(9): 2030-6.

Miyamoto, H, S Yoshida, H Taniguchi, et HA Shuman. «Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of chromosomal DNA.» *J Bacteriol*, 2003: 185: 6712-6718.

Molmeret, M, et al. «Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the *Legionella*-containing phagosome.» *Cell Microbiol*, 2004: 6: 33-48.

Molofsky, AB, et MS Swanson. «Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle.» *Mol Microbiol* (53:29-40), 2004: 53: 29-40.

Molofsky, AB, et MS Swanson. « *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication.» *Mol Microbiol*, 2003: 50: 445-461.

Molofsky, AB, et MS. Swanson. «Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle.» *Mol Microbiol*, 2004: 53: 29-40.

Moniot-Ville, N, et al. «Mechanisms of quinolone resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* highly resistant to fluoroquinolones but susceptible to nalidixic acid. Antimicrob Agents Chemother.» 1991: 35(3): 519-23.

Morash, M. G, A. K. C Brassinga, Warthan.M, Garduño, R.A Gourabathini.P, et S.D, Hoffman, P. S Goodman. «Reciprocal expression of integration host factor and HU in the developmental cycle and infectivity of *Legionella pneumophila*.» *Appl Environ Microbiol*, 2009: 75: 1826-1837.

Morgan-Linnell, SK, et al. «Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2009: 53(1): 235-41.

Morgan-Linnell, SK, et L Zechiedrich. «Contributions of the combined effects of topoisomerase mutations toward fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2007: 51(11): 4205-8.

Morrill, WE, JM Barbaree, BS Fields, GN Sanden, et WT Martin. «Increased recovery of *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin.» *J Clin Microbiol*, 1990: 28(3):616-8.

Morris JE, Pan XS, Fisher LM. «Grepafloxacin, a dimethyl derivative of ciprofloxacin, acts preferentially through gyrase in *Streptococcus pneumoniae*: role of the C-5 group in target specificity.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2002: 46(2):582-5.

Moss, CW, DE Karr, et SB Dees. «Cellular fatty acid composition of *Legionella longbeachae* sp.» *nov J Clin Microbiol*, 1981: 14: 692-694.

Moss, CW, et SB Dees. «Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires disease bacteria.» *J Clin Microbio*, 1979: 9(5): 648–649.

Moss, CW, WF Bibb, DE Karr, GO Guerrant, et MA Lambert. «Cellular fatty acid composition and ubiquinone content of *Legionella feeleii* sp. nov.» *J Clin Microbiol*, 1983: 18: 917-919.

Mulazimoglu, L, et VL Yu. «Can Legionnaires disease be diagnosed by clinical criteria? A critical review.» *Chest*, 2001: 120(4):1049-53.

Murdoch, DR, et al. «Use of the polymerase chaine reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia.» *Clin Infect Dis*, 1996: 23(3) : 475-80.

Murdoch, DR, et ST Chambers. «Detection of *Legionella* DNA in peripheral leukocytes, serum, and urine from a patient with pneumonia caused by *Legionella dumoffii.» Clin Infect Dis*, 2000: 30(2):382-3.

Murdoch, DR, et al. « Impact of routine systematic polymerase chain reaction testing on case finding for Legionnaires' disease: a pre-post comparison study.*» Clin Infect Dis*, 2013: 57(9):1275-81.

Musso, D, et al. «Sequence of quinolone resistance-determining region of *gyrA* gene for clinical isolates and for an in vitro-selected quinolone-resistant strain of *Coxiella burnetii.» Antimicrob Agents Chemother*, 1996: 40(4): 870-3.

Mykietiuk, A, et al. «Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella pneumophila* in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy.» *Clin Infect Dis*, 2005: 40(6) : 794-9.

Nagai, H, JC Kagan, X Zhu, RA Kahn, et CR Roy. «A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes.» *Science* , 2002: 295: 679-682.

Nagelkerke, NJ, HC Boshuizen, HE de Melker, JF Schellekens, et MF Peeters. «Estimating the incidence of subclinical infections with *Legionella Pneumonia* using data augmentation: analysis of an outbreak in The Netherlands.» *Stat Med*, 2003: 22(24):3713-24.

Nakamura, S, et al. «*gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1989: 33(2): 254-5.

Neumann, UP, et al. «Simultaneous splenectomy increases risk for opportunistic pneumonia in patients after liver transplantation.» *Transpl Int*, 2002: 15(5): 226-32.

Newton, HJ, DKY Ang, IR van Driel, et EL Hartland. «Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*.» *Clin Microbiol Rev*, 2010: 23: 274-298.

Nguyen, T, P Matsiota-Bernard, et Nauciel C. «Evaluation of an ELISA technique for the serodiagnosis of leginnaires'disease.» *Patho Biol*, 1995: 43(5) : 407-10.

Ni Bhriain, N, CJ Dorman, et CF Higgins. «An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression.» *Mol Microbiol*, 1989: 3: 933-942.

Nielsen, K, JM Bangsborg, et N Hoiby. «Susceptibility of *Legionella* species to five antibiotics and development of resistance by exposure to erythromycin, ciprofloxacin, and rifampicin.» *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2000: 36(1): 43-8.

Noguchi, N, et al. «Susceptibility and resistance genes to fluoroquinolones in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in 2002.» *Int J Antimicrob Agents*, 2005: 25(5): 374-9.

Nowicki, M, JC Paucod, N Bornestein, H Meugnier, P Isoard, et J Fleurette. «Comparative efficacy of five antibiotics on expremental airborne legionellosis in guinea-pigs.» *J Antimicrob Chemother*, 1988: 18(2) : 251-60.

O'Brien, Thomas F. «emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use ofan antimicrobial anywhere can increase to any antimicrobial anywhere else.» *Clin Infect Dis*, 2002: 34 (3): S78-S84.

Otani, T, et al. «In vitro and in vivo antibacterial activities of DK-507k, a novel fluoroquinolone.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2003: 47(12):3750-9.

Ott, M, P Messner, J Heesemann, R Marre, et J Hacker. «Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*.» *J Gen Microbiol*, 1991: 137: 1955-1961.

Ozerol, IH, et al. «Legionnaire's disease: a nosocomial outbreak in Turkey.» *J Hosp Infect*, 2006: 62(1): p. 50-7.

Palusinska-Szysz, M, et M Cendrowska-Pinkosz. «Pathogenicity of the family *Legionellaceae*.» *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009: 57(4): 279-90.

Pan, XS, et LM Fisher. «Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1997: 41(2):471-4.

Pan, XS, G Yague, et LM Fisher. «Quinolone resistance mutations in *Streptococcus pneumoniae* GyrA and ParC proteins: mechanistic insights into quinolone action from enzymatic analysis, intracellular levels, and phenotypes of wild-type and mutant proteins.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2001: 45(11):3140-7.

Park, M, ST Yun, S Hwang, C Chun, et TI Ahn. « The *dps* gene of symbiotic "Candidatus Legionella jeonii" in Amoeba proteus responds to hydrogen peroxide and phagocytosis.» *J Bacteriol*, 2006: 188: 7572-7580.

Pasculle, AW, et al. «*Pittsburgh pneumonia* agent: direct isolation from human lung tissue.» *J Infect Dis*, 1980: 141(6): 727-32.

Paul Christian Lück, Enno Jacobs, Isolde Röske, Ute Schröter-Bobsin, Roger Dumke, et Sabine Gronow. «*Legionella dresdenensis* sp. nov., isolated from river water , .» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010: 60: 2557–2562.

Pedro-Botet, L, et VL Yu. «*Legionella*: macrolides or quinolones?» *Clin Microbiol Infect*, 2006: 12 Suppl 3:25-30.

Pendland, SL, SJ Martin, C Chen, PC Schreckenberger, et LH Danziger. «Comparison of charcoal- and starch-based media for testing susceptibilities of *Legionella* species to macrolides, azalides, and fluoroquinolones.» *J Clin Microbiol* , 1997: 35(11):3004-6.

Pérez-Trallero, E, JM Marimon, L Iglesias, et J Larruskain. «Fluoroquinolone and macrolide treatment failure in pneumococcal pneumonia and selection of multidrug-resistant isolates.» *Emerg Infect Dis*, 2003: 9(9):1159-62.

Périchon, B, P Courvalin, et M Galimand. «Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2007: 51(7):2464-9.

Peter, BJ, J Arsuaga, AM Breier, AB Khodursky, PO Brown, et NR Cozzarelli. «Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*.» *Genome Biol*, 2004: 5: R87.

Phillips, I, et A King. «Comparative activity of the 4-quinolones.» *Rev Infect Dis*, 1988: 10 Suppl 1:S70-6.

Piddock, LJ. « Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria.» *Clin Microbiol Rev*, 2006: 19(2): 382-402.

Piso, RJ, A Caruso, et M Nebiker. «Hose as a source of *Legionella pneumonia*. A new risk factor for gardeners.» *J Hosp Infect*, 2007: 67(4): 396-7.

Plouffe, JF, et al. «Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group.» *Clin Infect Dis*, 1995: 20(5): 1286-91.

Pohlod, DJ, LD Saravolatz, EL Quinn, et MM Somerville. «The effect of inoculum, culture medium and antimicrobial combinations on the in-vitro susceptibilities of *Legionella pneumophila*.» *J Antimicrob Chemother*, 1981: 7(4):335-41.

Poole, K, et R Srikumar. «Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance.» *Curr Top Med Chem*, 2001: 1(1): 59-71.

Pruss, GJ, et K Drlica. «DNA supercoiling and prokaryotic transcription.» *Cell*, 1989: 56: 521-523.

Quinn, FD, et LS Tompkins. «Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities.» *Mol Microbiol*, 1989: 3: 797-805.

Ramirez, JA, JT Summersgill, RD Miller, TL Meyers, et MJ Raff. «Comparative study of the bactericidal activity of ampicillin/sulbactam and erythromycin against intracellular *Legionella pneumophila*.» *J Antimicrob Chemother*, 1993: 32(1):93-9.

Ramirez, JA, S Ahkee, A Tolentino, RD Miller, et JT Summersgill. «Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen.» *Diagn Microbiol*, 1996: 24(1): 7-14.

Ratcliff, RM, JA Lanser, PA Manning, et MW Heuzenroeder. «Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene.» *J Clin Microbiol*, 1998: 36(6):1560-7.

Ravanel, N, B Gestin, et M Maurin. «In vitro selection of fluoroquinolone resistance in Brucella melitensis.» *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009: 34(1): 76-81 .

Reinthaler, FF, J Sattler, K Schaffler-Dullnig, B Weinmayr, et E Marth. «Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals.» *J Clin Microbiol*, 1993: 31(5):1213-6.

Reischl, U, HJ Linde, N Lehn, O Landt, K Barratt, et N Wellinghausen. «Direct detection and differentiation of *Legionella spp*. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual color real-time PCR and melting curve analysis.» *J Clin Microbiol*, 2002: 40(10): 3814-7.

Reyes-Dominguez, Y, G Contreras-Ferrat, J Ramirez-Santos, J Membrillo-Hernandez, et MC Gomez-Eichelmann. «Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells.» *J Bacteriol*, 2003: 185: 1097-1100.

Rhomberg, PR, et RN Jones. «Evaluations of the Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Legionella pneumophila*, including validation of the i*mip*enem and sparfloxacin strips.» *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1994: 20(3):159-62.

Ridenour, DA, SLG Cirillo, S Feng, MM Samrakandi, et JD Cirillo. «Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion.» *Infect Immun*, 2003: 71: 6256-6263.

Riffard, S. *Detection, identification, épidémiologiedesLegionella par amplification génique, Lyon 1*. 1997.

Rihs, JD, VL Yu, JJ Zuravleff, A Goetz, et RR Muder. «Isolation of *Legionella pneumophila* from blood with the BACTEC system: a prospective study yielding positive results.» *J Clin Microbiol*, 1985: 22(3):422-4.

Robey, M, et NP Cianciotto. « *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection.» *Infect Immun*, 2002: 70: 5659-5669.

Robicsek, A, et al. «Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase.» *Nat Med*, 2006 : 12(1):83-8.

Robicsek, A, GA Jacoby, et Dc Hooper. «The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance.» *Lancet Infect Dis*, 2006: 6(10):629-40.

Roch, N, et M Maurin. «Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay.» *J Antimicrob Chemother*, 2005: 55(6):866-71.

Rodríguez-Martínez, JM, ME Cano, C Velasco, L Martínez-Martínez, et A Pascual. «Plasmid-mediated quinolone resistance: an update.» *J Infect Chemother*, 2011: 17(2):149-82.

Roig, J, C Domingo, et J Morera. «Legionnaires' disease.» *Chest*, 1994: 105(6): 1817-25.

Roige, J, et J Rello. «Legionnaires'disease : a rational approch to therapy.» *J Antimicrob Chemother*, 2003: 51(5) : 1119-29.

Rossier, O, et NP Cianciotto. «Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*.» *Infect.Immun*, 2001: 69: 2092-2098.

Rossier, O, SR Starkenburg, et NP Cianciott. « *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia.» *Infect Immun*, 2004: 72: 310-321.

Rowbotham, TJ. «*Legionella-like* amoebal pathogens. In : Barbaree JM, Breiman RF, dufour AP(ed). legionella : current statuds and emerging perspectives.» *ASM press, Washington D.c*, 1993: 137-40.

Rowbotham, TJ. « Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae.» *J Clin Pathol*, 1980: 33(12): 1179-83.

Ruckdeschel, G, et A Dalhoff. «The in-vitro activity of moxifloxacin against *Legionella* species and the effects of medium on susceptibility test results.» *J Antimicrob Chemother*, 1999: 43 Suppl B:25-9.

Ruf, B, D Schürmann, I Horbach, FJ Fehrenbach, et HD Pohle. «Prevalence and diagnosis of *Legionella pneumophila*: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection.» *J Infect Dis*, 1990: 162: 1341-1348.

Rui, S, et Y Tse-Dinh. «Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge.» *Front Biosci*, 2003: 8: d256-263.

Ruiz, J. «Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection.» *J Antimicrob Chemother*, 2003: 51(5): 1109-17.

Sabria, M, et VL Yu. «Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection.» *Lancet Infect Dis*, 2002: 2(6): 368-73.

Sadosky, AB, JW Wilson, HM Steinman, et HA Shuman. «The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability.» *J Bacteriol* , 1994: 176: 3790-3799.

Sáenz, Y, M Zarazaga, L Briñas, F Ruiz-Larrea, et C Torres. «Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals.» *J Antimicrob Chemother*, 2003: 51(4):1001-5.

Sahney, N. N, J. T Summersgill, J. A Ramirez, et R. D Miller. «Inhibition of oxidative burst and chemotaxis in human phagocytes by *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease.» *J Med Microbiol*, 2001: 50(6): 517-525.

Saito, a, et al. «Susceptibility of *Legionella pneumophila* to ofloxacin in vitro and in experimental *Legionella pneumonia* in guinea pigs.» *Antimicrob Agents Chemoter*, 1985: 28(1) : 15-20.

Sakamoto, R, et al. « *Legionella pneumophila* in rainwater on roads.» *Emerg Infect Dis*, 2009: 15(8): 1295-7.

Sandkovsky, U, G Sandkovsky, J Suh, B Smith, V Sharp, et B Polsky. «*Legionella pneumonia* and HIV: case reports and review of the literature.» *AIDS Patient Care STDS*, 2008: 22(6):473-81.

Sauer, J, MA Bachman, et MS Swanson. «The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages.» *Proc 1atl Acad Sci U.S.A*, 2005: 102: 9924-9929.

Schneider, R, A Travers, T Kutateladze, et G Muskhelishvili. «A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*.» *Mol Microbiol*, 1999: 34: 953-964.

Schulin, T, et and al. «Susceptibilities of *Legionella spp*. to newer antimicrobials in vitro.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1998: 42(6): 1520-3.

Segal, G, M Feldman, et T Zusman. «The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and Coxiella *burnetii*.» *FEMS Microbiol Rev*, 2005: 29: 65-81.

Segal, G, M Purcell, et HA Shuman. «Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome.» *Proc 1atl Acad Sci. U.S.A*, 1998: 95: 1669-1674.

Segreti, J, P Meyer, et K Kapell. «In vitro activity of macrolides against intracellular *Legionella pneumophila*.» *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1996: 25(3):123-6.

Shen, X, et al. «Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response.» *Cell Microbiol*, 2009: 11: 911-926.

Sire, S, T Staub, et Christmann D. «Manifestations extra-pulmonaires des legionelloses.» *Medecine et Maladies Infectieuses*, 1994: 4 : 874-80.

Skippington, E, et MA Ragan. «Lateral genetic transfer and the construction of genetic exchange communities.» *FEMS Microbiol Rev*, 2011: 35(5):707–35.

Smalley, DL, et DD Ourth. «Seroepidemiology of *Legionella pneumophila*. A study of adults from Memphis, Tennessee, U. S. A.» *Am J Clin Pathol*, 1981: 75(2):201-3.

Soderberg, MA, J Dao, SR Starkenburg, et NP Cianciotto. «Importance of type II secretion for survival of *Legionella pneumophila* in tap water and in amoebae at low temperatures.» *Appl Environ Microbiol*, 2008: 74: 5583-5588.

Sommer, JB, FJ Eurbguth, et B Neudorfer. «Acute disseminated encephalomyelitis following *Legionella pneumophila* infection.» *Eur Neurol*, 2000: 44(3) : 182-4.

Sonesson, A, E Jantez, K Bryn, T Tangen, J eng, et U Zahringer. «Composition of 2,3-dihydroxy fatty acid-containing lipopolysaccharides from *legionella israelensis*, *Legionella maceachernii* and legionella *micdadei.» Microbiologie*, 1994: 140(pt6): 1261-71.

Sopena, N, et al. «Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002: 21(12): 845-8.

Sopena, N, et al. «Comparative study of the clinical presentation of *Legionella pneumonia* and other community-acquired pneumonias.» *Chest*, 1998 : 113(5):1195-200.

Springer, N, Ludwig, W, Drozanski, W, et R, Schleifer, KH Amann. «The phylogenetic status of *Sacrobium lyticum* ,anobligate intracellular bacterial parasite of small amoebae .» *FEMS Microbiol Lett*, 1992: 75(2-3) :199-202.

St John, G, et HM Steinman. «Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival.» *J Bacteriol*, 1996: 178: 1578-1584.

Steinert, M, K Heuner, C Buchrieser, C Albert-Weissenberger, et G Glockner. «*Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cellresponse.» *International Journal of Medical Microbiology*, 2007: 297: 577-587.

Stewart, CR, O Rossier, et NP Cianciotto. «Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion.» *J Bacteriol* , 2009: 191: 1537-1546.

Stolhaug, A, et K Bergh. « Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella spp*. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by *mip* sequencing.» *Appl Environ Microbiol*, 2006: 72(9): 6394-8.

Stone, BJ, et Y Abu Kuaik. «Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells.» *Infec Immun*, 1998: 66: 1768-1775.

Stout, JE, B Arnold, et VL Yu. «Activity of azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, dirithromycin, quinupristin/dalfopristin and erythromycin against *Legionella* species by intracellular susceptibility testing in HL-60 cells.» *J Antimicrob Chemeoth*, 1998: 4(2) : 289-91.

Stout, JE, B Arnold, et VL Yu. «Comparative activity of ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, and erythromycin against *Legionella* species by broth microdilution and intracellular susceptibility testing in HL-60 cells.» *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1998: 30(1).

Stout, JE, et VL Yu. «Legionellosis.» *N Engl J Med*, 1997: 337(10): 682-7.

Stout, JE, K Sens, S Mietzner, A Obman, et VL Yu. «Comparative activity of quinolones, macrolides and ketolides against Legionella species using in vitro broth dilution and intracellular susceptibility testing.» *Int J Antimicrob Agents*, 2005: 25(4):302-7.

Sukul, P, et M Spiteller. «Fluoroquinolone antibiotics in the environment.» *Rev Environ Contam Toxicol*, 2007: 191:131-62.

Sutak, R, E Lesuisse, J Tachezy, et DR Richardson. «Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence.» *Trends Microbiol*, 2008: 16: 261-268.

Swanson, MS, et BK Hammer. « *Legionella pneumophila* pathogenesis:a fateful journey from amoeba to macrophages.» *Ann rev Microbiol*, 2000: 54: 567-613.

Takemura, H, et al. «Evaluation of a human monocytic cell line THP-1 model for assay of the intracellular activities of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila*.» *J Antimicrob Chemother*, 2000: 46(4): 589-94.

Tambau, E., et al. «Novel gyrA point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1993: 37(6): 1247-52.

Tan, JS, jJr File TM, diapesio LP dipersio JR, R hamor, ld aravolatz, et al. «Persistently positive culture results in a patient with community-acquired pneumonia due to *Legionella pneumophila*.» *Clin Infect Dis*, 2001: 32(11): 1562-6.

Tavío, MM, J Vila, J Ruiz, J Ruiz, et AM, Jiménez de Anta MT Martín-Sánchez. «Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates.» *J Antimicrob Chemother*, 1999: 44(6):735-42.

Taylor, AG, et TG Harrison. «Formalised yolk sac antigen in early diagnosis of Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1.» *Lancet*, 1981: 2(8246):591-2.

Taylor, TH, et MA Albrecht. «*Legionella bozemanii* cavitary pneumonia poorly responsive to erythromycin: case report and review.» *Clin Infect Dis*, 1995: 20(2):329-34.

Templeton, KE, SA Scheltinga, et P Sillekens. «Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species.» *J Clin Microbiol*, 2003: 41(9):4016-21.

Tilton, RC. «Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay.» *Ann Intern Med*, 1979: 90(4):697-8.

Tkatch, LS, S Kusne, WD Irish, S Krystofiac, et E Wing. «Epidemiology of *Legionella pneumonia* and factors associated with *Legionella*-related mortality at a tertiary care centre.» *Clin Infect Dis*, 1998: 27(6) : 1479-86.

Tossa, P, et al. «Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies.» *BMC Public Health*, 2006: 2006. 6: p. 112.

Tran, JH, GA Jacoby, et DC Hooper. «Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2005: 49(7):3050-2.

Truong, QC, JC, Shlaes, D Nguyen Van, L Gutmann, et NJ Moreau. «A novel, double mutation in DNA gyrase A of *Escherichia coli* conferring resistance to quinolone antibiotics.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1997 : 41(1):85-90 .

Turkmani, A, A Psaroulaki, A Christidou, D Chochlakis, D Tabaa, et Y Tselentis. « In vitro-selected resistance to fluoroquinolones in two *Brucella* strains associated with mutational changes in *gyrA*.» *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008: 32(3) : 227-232.

Underwood AP, G Jones, M Mentasti, NK Fry, TG Harrison. « Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing.» *BMC Microbiol*, 2013: 13: 302.

UfSaCoC, Unit for Surveillance and Control of Communicable Diseases. «Legionnaires diseases in a néonatal unit of a private hospital, Cuprus, Decembre2008, preliminary outbreak report.» *Euro Surveill* , 2009: 14(2).

Valens, M, S Penaud, M Rossignol, F Cornet, et F Boccard. «Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome.» *EMBO J*, 2004: 23: 4330-4341.

Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. «Quinolones in 2005: an update.» *Clin Microbiol Infect*, 2005: 11(4):256-80.

Vandenesch, F, et al. «Relationship between free amoeba and *Legionella*: studies in vitro and in vivo.» *Zentralbl Bakteriol*, 1990: 272(3):265-75.

Viasus, D, et al. « Community-acquired *Legionella pneumophila* pneumonia: a single-center experience with 214 hospitalized sporadic cases over 15 years.» *Medicine*, 2013: 92(1):51-60.

Vila, J, et al. «Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1994: 38(10): 2477-9.

Vildé, JL, E Dournon, et P Rajagopalan. «Inhibition of *Legionella pneumophila* multiplication within human macrophages by antimicrobial agents.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1986: 30(5):743-8.

Vincent, CD, JR Friedman, KC Jeong, EC Buford, JL Miller, et JP Vogel. «Identification of the core transmembrane complex of the Legionella Dot/Icm type IV secretion system.» *Mol Microbiol*, 2006: 62: 1278-1291.

Viswanathan, VK, et al. «The cytochrome c maturation locus of *Legionella pneumophila* promotes iron assi milation and intracellular infection and contains a strain-specific insertion sequeence element.» *Infect Immun*, 2002: 70:1842-1852.

Viswanathan, VK, PH Edelstein, CD Pope, et NP Cianciotto. «The *Legionella pneumophila* iraAB locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence.» *Infect Immun*, 2000: 68: 1069-1079.

Vogel, JP, HL Andrews, SK Wong, et RR Isberg. «Conjugative Transfer by the Virulence, System of *Legionella pneumophila*.» *Science*, 1998: 279: 873-876.

Wadowsky, RM, et RB Yee. «Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens.» *Appl Environ Microbiol*, 1981: 42(5):768-72.

Wang, EE, B Manson, M Corey, K Bernard, et CG Prober. «False positivity of *Legionella* serology in patients with cystic fibrosis.» *Pediatr Infect Dis J*, 1987: 6: 256-259.

Wang, X, AK Dubey, K Suzuki, CS, Babitzke, P Baker, et T Romeo. «CsrA posttranscriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*.» *Mol Microbiol*, 2005: 56: 1648-1663.

Weigel, L.M, GJ Anderson, et FC Tenover. «DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2002: 46(8): 2582-7.

Weinstein-Fischer, D, M Elgrably-Weiss, et S Altuvia. «*Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis.» *Mol Microbiol*, 2000: 35: 1413-1420.

Wieland, H, M Faigle, F Lang, H Northoff, et B Neumeister. «Regulation of the *Legionella mip*-promotor during infection of human monocytes.» *FEMS Microbiol Lett*, 2002: 212: 127-132.

Wilkinson, HW, AL Reingold, BJ Brake, DL McGiboney, GW Gorman, et CV Broome. «Reactivity of serum from patients with suspected legionellosis against 29 antigens of *legionellaceae* and Legionella-like organisms by indirect immunofluorescence assay.» *J Infect Dis*, 1983: 147(1): 23-31.

Wilkinson, HW, CE Farshy, BJ Fikes, DD Cruce, et LP Yealy. «Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *Legionella pneumophila* and inhibition of titers against nonspecific, gram-negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis.» *J Clin Microbiol*, 1979: 10(5): 5685-689.

Willmott, CJ, et A Maxwell. «A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1993: 37(1):126-7.

Wilson, DA, B Yen-Lieberman, IU Reischl, I Warshawsky, et GW Procop. «Comparison of five methods for extraction of *Legionella pneumophila* from respiratory specimens.» *J Clin Microbiol*, 2004: 42(12):5913-6.

Wilson, DA, B Yen-Lieberman, IU Reisch, SM Gordon, et Procop, et GW. «Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene.» *J Clin Microbiol*, 2003: 41(7):3327-30.

Woese, CR. «Bacterial evolution .» *Microbiol Rev*, 1987: 51(2) : 221-71.

Wong, KH, CW Moss, DH Hochstein, RJ Arko, et WO Schalla. «« Endotoxicity » of the legionnaires'disease bacterium.» *Ann Intern Med*, 1979: ann intern med 90(4): 624-7.

Woodhead, W. «Community_acquired pneumonia in Europe : causative pathogens and resistance patterns.» *Eur Respir J Suppl*, 2002: 36 :20s-7s.

Yamane, K, et al. «New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate.» *Antimicrob Agents Chemother*, 2005: 51(9): 3354-3360.

Yanez, MA, C Carrasco-Serrano, VM Barbera, et V Catalan. «Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purfication and real- time PCR amplification of the *dotA* gene.» *Appl Environ Microbiol*, 2005: 71: 3433-3441.

Ye, F, T Brauer, E Niehus, K Drlica, C Josenhans, et S Suerbaum. «Flagellar and global gene regulation in *Helicobacter pylori* modulated by changes in DNA supercoiling.» *Int J Med Microbiol*, 2007: 297: 65-81.

Yokoi, S, et al. «Uncommon occurrence of fluoroquinolone resistance-associated alterations in GyrA and ParC in clinical strains of *Chlamydia trachomatis*.» *J Infect Chemother*, 2004: 10(5): 262-7.

Yoshida, H, et al. «Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1990: 34(6): 1271-2.

Yoshida, H, i M Bogak, M Nakamura, LM Yamanaka, et S Nakamura. «Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*.» *Antimicrob Agents Chemother*, 1991: 35(8):1647-50.

Yu, M, J Ren, Y Zeng, S Zhou, et Y Lu. «The *Legionella pneumophila* Dps homolog isregulated by iron and involved in multiple stress tolerance.» *J Basic Microbiol*, 2009: 49 suppl 1: S79-86.

Yzerman, EPF, JW den Boer, KD Lettinga, J Schellekens, J Dankert, et M Peeters. «Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in The Netherlands.» *J Clin Microbiol*, 2002: 40: 3232-323.

Zechiedrich, EL, AB Khodursky, et NR Cozzarelli. «Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*.» *Genes Dev*, 1997: 11: 2580-2592.

Zechiedrich, EL, et al. «Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*.» *J Biol Chem*, 2000: 275: 8103-8113.

Zhang, X.X, T Zhan, et Fang H.H.P. «Antibiotic resistance genes in water environment.» *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009: 83:397-414.

Zhao X, Xu C, Domagala J, Drlica K. «DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997: 94(25):13991-6.

Zimmerman, SE, ML French, SD Allen, E Wilson, et RB Kohler. «Immunoglobulin M antibody titers in the diagnosis of Legionnaires disease.» *J Clin Microbiol*, 1982: 16(6):1007-11.

Zou, CH, YA Knirel, JH Helbig, U Zahringer, et CS Mintz. «Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O acetylation of the O polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide.» *J Bacteriol*, 1999: 181: 4137-4141.

Zusman, T, et al. «The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*.» *Mol Microbiol*, 2007: 63:1508-1523.

Résumé

Legionella pneumophila est une bactérie à Gram négatif, intracellulaire facultative, responsable de la légionellose (ou maladie des Légionnaires) chez l'Homme. Les fluoroquinolones et les macrolides sont utilisés en première intention dans le traitement antibiotique de cette maladie. Cependant, les échecs thérapeutiques sont fréquents, et le taux de mortalité demeure élevé (10-15% des cas, plus de 30% chez le patient immunodéprimé). Bien qu'aucune souche de *L. pneumophila* résistante à ces antibiotiques n'ait été isolée à ce jour, ces échecs peuvent faire évoquer la possibilité d'une sélection *in vivo* de mutants résistants. Le mécanisme génétique principal d'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones correspond à l'accumulation de mutations au niveau des gènes codant pour l'ADN gyrase et la topoisomérase IV ; en particulier celles affectant les codons en positions 83 et 87 du QRDR (quinolone resistance determining region) du gène *gyrA* entrainent une résistance de haut niveau à ces antibiotiques.

Le première aspect de notre projet était d'élaborer un test de PCR en temps réel permettant de détecter chez *L. pneumophila* des mutants *gyrA* résistants aux fluoroquinolones et de les différencier des souches sauvages par analyse des températures de fusion des amplifias obtenus. Après optimisation, ce test nommé qPCRgyrALp amplifie spécifiquement une portion du QRDR du gène *gyrA* de l'espèce *L. pneumophila* et permet de détecter et de différencier les mutations *gyrA83* et *gyrA87*. Nous avons ensuite utilisé ce test pour la recherche de mutants *gyrA* directement dans divers prélèvements respiratoires provenant de 82 patients atteints de légionellose, certains en échec thérapeutique après traitement par une fluoroquinolone. Les résultats ont montré pour quatre patients un profil de courbe de fusion semblable à celui du mutant *gyrA83*. Le séquençage du QRDR de *gyrA* à partir de ces prélèvements respiratoires a confirmé cette mutation chez deux patients. L'utilisation de la technique de séquençage à haut débit a permis de quantifier ces mutants *gyrA83* chez ces

deux patients, permettant de montrer un remplacement progressif *in vivo* de la population de *L. pneumophila* sensible aux fluoroquinolones par une population résistante à ces antibiotiques.

Le deuxième aspect de notre travail a été de développer des tests de PCR quantitative en temps réel (qPCR) permettant de quantifier la charge bactérienne à *L. pneumophila* dans les prélèvements cliniques des patients infectés, avant et au cours du traitement antibiotique, dans la but de prédire l'évolution clinique et le pronostic final de ces patients. Nous avons utilisé deux tests de qPCR, ciblant soit le gène codant pour l'ARNr16s (qPCR16S) soit le gène *mip* (qPCRmip) dans des prélèvements respiratoires de 114 patients atteints de légionellose. Chez certains patients, nous avons pu déterminer la cinétique de la charge bactérienne au cours du temps, alors que les patients recevaient une antibiothérapie adaptée. Les premières cinétiques recueillies montrent la possibilité de différencier les patients qui répondent rapidement au traitement antibiotique et évoluent favorablement au cours de la 1ère semaine d'hospitalisation, de ceux qui présentent une réponse modeste au traitement et nécessitent une hospitalisation prolongée, voire décèdent. La PCR en temps réel semble donc représenter un outil pronostique d'intérêt au cours de la légionellose. Le type de cinétique observé chez un patient donné semble pouvoir prédire l'évolution des patients et la nécessité d'ajuster le traitement antibiotique.

Summary

Legionella pneumophila is a Gram- negative, facultative intracellular bacterium responsible for legionellosis (or Legionnaires' disease) in humans. The fluoroquinolones and the macrolides are used as first-line antibiotic treatment of this disease. However, treatment failures are common, and the mortality rates remain high (10-15 % of cases, more than 30% in immunocompromised patients). Although *L. pneumophila* strain resistant to these antibiotics have never been isolated, treatment failures may suggest the possibility of *in vivo* selection of resistant mutants. The main genetic mechanisms associated with acquired resistance to fluoroquinolones correspond to the accumulation of mutations in the genes encoding DNA gyrase and topoisomerase IV, especially those affecting codons 83 and 87 of the QRDR (quinolone resistance determining region) of the *gyrA* gene, which are associated with high level resistance to these antibiotics.

The first aspect of our project was to develop a real-time PCR test to detect *gyrA* QRDR mutants and differentiate them from wild-type strains of *L. pneumophila* by analysis of melting temperatures of the amplified DNA. After optimization, the qPCRgyrALp test specifically amplified a portion of the *gyrA* QRDR of *L. pneumophila* and could detect and differentiate *gyrA83* and *gyrA87* mutations. Then, we checked the presence of *gyrA* mutants directly in respiratory samples collected in 82 legionellosis patients, including some after treatment failure with a fluoroquinolone. For four patients, results corresponded to a melting curve profile similar to that of the *gyrA83* mutant. Amplification and sequencing of the *gyrA* QRDR directly from these respiratory samples confirmed this mutation in two patients. The use of high-throughput sequencing technology allowed us to quantify the *gyrA83* mutants in these two patients, allowing demonstration of *in vivo* gradual replacement of the fluoroquinolones susceptible population of *L. pneumophila* by a resistant one.

The second aspect of our work was to develop quantitative real-time PCR tests offering the possibility to quantify the *L. pneumophila* bacterial load in respiratory specimens before and during antibiotic treatment, in order to predict the clinical course and the final prognosis of these patients. We used two qPCR tests, either targeting the gene encoding 16S rRNA (qPCR16S) or the *mip* gene (qPCRmip) in respiratory samples from 114 patients with Legionnaires' disease. In some patients, we determined the kinetics of bacterial loads over time, while patients received appropriate antibiotic therapy. The kinetics we observed allowed differentiation of patients who respond quickly to antibiotic treatment and were released from hospital within the first week following admission, from those with a modest response to treatment and requiring prolonged hospitalization or finally died. Thus, our real-time PCR tests seem to be good prognostic tools for evaluation of legionellosis prognosis. The type of kinetics observed in a given patient may allow the clinician to predict the evolution of patients and the need to adjust the antibiotic treatment.