



HAL
open science

Legionella pneumophila et macrolides : de l'antibiogramme à la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance

Ghislaine Descours

► **To cite this version:**

Ghislaine Descours. Legionella pneumophila et macrolides : de l'antibiogramme à la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance. Bactériologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10282 . tel-02612567

HAL Id: tel-02612567

<https://theses.hal.science/tel-02612567>

Submitted on 19 May 2020

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale « Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation »

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 20 décembre 2013

par

Ghislaine DESCOURS

***Legionella pneumophila* et macrolides :
de l'antibiogramme à la caractérisation des mécanismes
moléculaires impliqués dans la résistance**

Directeur de thèse : Docteur Sophie JARRAUD

Co-encadrant : Docteur Christophe GINEVRA

JURY

Professeur Cécile BEBEAR, rapporteur

Docteur Jean-Ralph ZAHAR, rapporteur

Professeur Jérôme ETIENNE

Professeur Jean FRENEY

Professeur Max MAURIN

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –
Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques
et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. P. FOURNIER

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. C. VITON

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes plus sincères remerciements à l'ensemble des membres du Jury : au Professeur Cécile Bébéar, au Professeur Max Maurin ainsi qu'au Docteur Jean-Ralph Zahar qui ont eu la patience de lire ce manuscrit et de juger mon travail.

Ma profonde gratitude va au Professeur Jérôme Etienne qui m'a accordé sa confiance en m'accueillant dans son service puis en me permettant de poursuivre l'aventure.

Je remercie vivement le Professeur Jean Freney qui, durant mes études de Pharmacie, a su me transmettre sa passion pour la Microbiologie. Merci pour votre soutien et vos encouragements tout au long de cette dernière année.

Je ne remercierai jamais assez ma directrice et mon co-directeur de Thèse. Vous avez partagé mes inquiétudes et m'avez toujours encouragée à persévérer. Sophie, tu m'as accompagnée depuis plusieurs années et j'ai énormément appris à tes côtés. Merci pour tes relectures à des heures tardives, ton soutien indéfectible et tes qualités humaines. Christophe, ta passion pour la recherche et ton enthousiasme sont communicatifs ! Tu as toujours su te rendre disponible et tu as fait preuve de beaucoup de patience. Merci !

Cette thèse est bien loin d'être un travail solitaire. Mes remerciements vont aussi à tous celles et ceux qui y ont contribué : Joëlle, Yvonne et bien sûr Françoise que j'ai retenue prisonnière au P3 pendant de nombreuses demi-journées...

Un immense merci au Professeur François Vandenesch, à mes collègues du Laboratoire de Bactériologie et de la Faculté de Pharmacie qui m'ont permis de mener de front mes travaux de Recherche, mes activités hospitalières et universitaires : Anne et Anne-Marie, une équipe de choc en Pédiatrie, Coralie, Olivier, Anne Do., Christine et tous les autres... Merci également à toute l'équipe du CNR Légionelles, du CBE et de l'Unité Inserm U1111, et tout particulièrement à Michèle, ma « colocataire » qui suit en direct toutes mes péripéties !

Merci à Alex, Juju, Marizou, Raph, Claire, Sarah, Audrey, Anne-Lise, JE, Alexandre, Oriane, Clémentine, Charlotte, Marie, Adrien, Hélène, Nico, Olivier et Flo pour les grands et les petits bonheurs partagés.

Je ne saurai terminer par une pensée pour ma famille, ma grand-mère Julia, et ma mère pour son soutien constant et sans mesure, à qui je dois tout.

Merci enfin à mon époux qui m'a épaulée durant cette année marathon. Bientôt 2014!

Résumé en français

Les macrolides sont recommandés seuls ou en association dans le traitement des légionelloses. Cependant, malgré une antibiothérapie adaptée et l'absence de souches résistantes décrites, des échecs thérapeutiques sont régulièrement observés.

L'isolement de souches de *Legionella* à partir de prélèvements respiratoires est indispensable à la réalisation d'antibiogrammes mais il n'est obtenu que dans 24% des cas en France. Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord amélioré le rendement d'isolement des souches cliniques, notamment par des techniques de co-culture amibienne, avant de nous intéresser aux mécanismes pouvant expliquer les échecs thérapeutiques (antagonisme entre antibiotiques, sélection de résistance).

Nous avons pu montrer, dans un modèle de croissance intracellulaire de *Legionella pneumophila*, une absence d'antagonisme entre macrolides et fluoroquinolones ou rifampicine invalidant la première hypothèse.

Nous avons ensuite généré des lignées de mutants hautement résistants aux macrolides. Nous avons mis en évidence des mutations dans les gènes codant les protéines ribosomales L4 et L22 associées à un faible niveau de résistance. Des mutations dans les gènes codant l'ARN ribosomal 23S étaient associées à un niveau plus élevé de résistance, dépendant de la nature de la mutation et du nombre de copies du gène mutées. La facilité d'obtention de mutants résistants aux macrolides *in vitro* suggère une potentielle acquisition de résistance *in vivo* au décours de l'antibiothérapie et justifie une recherche systématique de cette résistance dans les prélèvements cliniques.

Titre en anglais

Legionella pneumophila and macrolides: from susceptibility testing to characterization of molecular mechanisms conferring resistance.

Résumé en anglais

Macrolides, alone or in combination, are recommended as first-line therapy of Legionnaires' disease. *Legionella pneumophila* is characterized by a constant *in vitro* susceptibility to macrolides. Resistant variants have never been detected, in contrast with several therapeutic failures observed in patients receiving an adequate treatment.

Legionellae isolation from respiratory secretions is needed for antibiotic susceptibility testing, but the reported culture sensitivity reaches only 24% in France.

In this work, we improved *Legionellae* isolation rate by culture and amoebal co-culture. In a second time, we were interested in hypothetical mechanisms involved in therapeutic failures like antibiotic antagonisms and acquired resistance.

We found no antagonistic effects for macrolide/fluoroquinolones and macrolide/rifampin combinations in an intracellular *Legionella* model, which made irrelevant our first hypothesis.

In a last step, we propagated *Legionella* strains with increasing macrolides concentrations. This procedure provided us high-level macrolides-resistant mutants. We found that mutations in the genes encoding L4 and L22 proteins were correlated with low-level resistance. Mutations in domain V of the 23S rRNA were associated with intermediate or high-level resistance. We found a correlation between the kind of nucleotide substitution or the number of mutated ribosomal operons and the resistance level.

The speed and efficiency of *in vitro* selection of *L. pneumophila* macrolide-resistant mutants suggest a potential acquisition of macrolide resistance in patients under therapy and emphasize the need to explore clinical *Legionella* macrolide susceptibility in order to track down resistance.

Mots clés en français

Legionella, résistance, macrolides, échecs thérapeutiques, co-culture amibienne, ribosome, ARNr 23S, protéines ribosomales L4 / L22

Mots clés en anglais

Legionella, resistance, macrolides, therapeutic failure, amoebal co-culture, ribosome, 23S rRNA, L4 / L22 proteins

Intitulé et adresse de l'unité ou du laboratoire

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
INSERM U1111 - CNRS UMR5308
Université Lyon 1, ENS de Lyon
Faculté de médecine Lyon Est - Claude Bernard
7 rue Guillaume Paradin, 69 372 Lyon Cedex 08
France

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	15
REVUE DE LA LITTERATURE.....	16
1 Rappels sur <i>Legionella</i>.....	17
1.1 Taxonomie.....	17
1.2 Habitat.....	19
1.2.1 Ecosystèmes naturels.....	19
1.2.2 Ecosystèmes artificiels.....	19
1.2.3 Rôle des protozoaires dans la persistance de <i>Legionella</i> dans l'environnement	19
1.3 Pouvoir pathogène.....	22
1.3.1 Modes de contamination.....	22
1.3.2 Réplication intracellulaire.....	22
1.3.3 Place de <i>Legionella</i> dans les pneumopathies aiguës.....	25
1.4 Diagnostic clinique et radiologique.....	26
1.4.1 La légionellose ou maladie des légionnaires.....	26
1.4.2 Manifestations extra-pulmonaires.....	29
1.4.3 Fièvre de Pontiac.....	29
1.5 Diagnostic biologique.....	30
1.5.1 Anomalies non spécifiques.....	30
1.5.2 Détection des antigènes urinaires.....	30
1.5.3 Culture sur milieu axénique.....	32
1.5.4 Co-culture amibienne.....	36
1.5.5 Techniques moléculaires.....	37
1.5.6 Sérologie.....	38
1.5.7 Performances et évolution des méthodes diagnostiques.....	39
2 <i>Legionella</i> et antibiotiques.....	41
2.1 Stratégie thérapeutique.....	41
2.1.1 Recommandations de l'Afssaps en France.....	41
2.1.2 Recommandations des autres sociétés savantes.....	44
2.1.3 Des recommandations aux pratiques quotidiennes.....	45
2.2 Etude de la sensibilité de <i>Legionella</i> aux antibiotiques.....	45
2.2.1 Indication de l'antibiogramme.....	45

2.2.2	Méthodes extracellulaires	46
2.2.3	Méthodes intracellulaires	53
2.2.4	Modèle animal.....	58
2.2.5	Etude des associations d'antibiotiques	58
2.2.6	Données cliniques.....	65
3	Les macrolides	67
3.1	Structure	67
3.2	Propriétés pharmacocinétiques	69
3.2.1	Erythromycine	69
3.2.2	Clarithromycine	69
3.2.3	Azithromycine	69
3.2.4	Autres macrolides	70
3.3	Activité anti-microbienne	70
3.4	Mécanisme d'action	71
3.4.1	Le ribosome bactérien, cible des macrolides.....	71
3.4.2	Interaction macrolide – ribosome.....	79
3.5	Les kétolides, une nouvelle classe de macrolides.....	82
3.6	Molécules apparentées aux macrolides	84
4	Mécanismes généraux de résistance aux macrolides.....	84
4.1	Modification de la cible	84
4.1.1	Méthylation de l'ARNr 23S.....	84
4.1.2	Modification de l'ARNr 23S ou des protéines ribosomales	85
4.2	Efflux de l'antibiotique.....	100
4.3	Inactivation enzymatique	102
4.4	Additivité des mécanismes	102
5	Annexes	103

TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	105
1 Introduction	106
2 Apport de la PCR quantitative en temps réel dans la détection et le suivi des patients en échec thérapeutique.....	107
3 Optimisation et développement de méthodes d'isolement de <i>Legionella</i> à partir de prélèvements respiratoires.....	113
4 Etude intracellulaire des associations d'antibiotiques sur <i>Legionella pneumophila</i>	123
5 Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de <i>Legionella pneumophila</i> aux macrolides	126
6 Conclusion, discussion et perspectives.....	137
BIBLIOGRAPHIE.....	149

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Afssaps	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de la Sécurité du Médicament
ARN	Acide ribonucléique
ARB	<i>Amoeba-resistant bacteria</i>
ASAT	Aspartate aminotransférase
BCYE	<i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
BSYE	<i>Buffered Starch Yeast Extract</i>
BYE	<i>Buffered Yeast Extract</i>
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CFU	Colonies Formant Unité
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNR	Centre National de Référence
CRP	<i>C reactive protein</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
ECMO	<i>Extracorporeal membrane oxygenation</i>
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Ig	Immunoglobulines
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IV	Intra-veineux
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LDH	Lactate déshydrogénase
LLAP	<i>Legionella-like amoebal pathogen</i>
Mip	<i>Macrophage infectivity potentiator</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
Momp	<i>Major outer membrane protein</i>
Pb	Paire de bases
PAS	<i>Page's amoebic saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>

PYG	<i>Peptone Yeast Glucose</i>
RE	Réticulum endoplasmique
SAL	Sérum anti-lymphocytaire
SBT	<i>Sequence based Typing</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

Liste des figures

Figure 1. Cycle intracellulaire de <i>L. pneumophila</i>	23
Figure 2. Macrophages U937 et <i>Acanthamoeba polyphaga</i> infectées par <i>L. pneumophila</i> à 24 heures	24
Figure 3. Evolution du nombre de cas de légionellose en France, 1988-2012.	26
Figure 4. Fiche de notification des cas de légionellose	31
Figure 5. Répartition des méthodes diagnostiques des cas de légionellose.....	40
Figure 6. Méthodes extracellulaires par diffusion (Etest® et disque) et par microdilution pour des genres bactériens autres que <i>Legionella</i>	47
Figure 7. Etude des associations d'antibiotiques : technique de l'échiquier	59
Figure 8. Structure chimique de macrolides.....	68
Figure 9. Structure et fonctionnement du ribosome de <i>Thermus thermophilus</i>	72
Figure 10. Vue globale de la synthèse protéique par le ribosome.	74
Figure 11. Structure secondaire de l'ARN ribosomal 23S.....	76
Figure 12. Protéines ribosomales de la sous-unité 50S.....	76
Figure 13. Coupe transversale de la sous-unité ribosomale 50S montrant le tunnel d'élongation peptidique	77
Figure 14. Sous-unité 50S et tunnel d'élongation polypeptidique	78
Figure 15. Interactions des macrolides avec les nucléotides de la cavité peptidyl-transférase et les protéines ribosomales L4 et L22	80
Figure 16. Tige 35 du domaine II et boucle centrale du domaine V de l'ARNr 23S	81
Figure 17. Site de liaison de la roxithromycine dans la cavité peptidyl-transférase de <i>Deinococcus radiodurans</i>	82
Figure 18. Structure chimique de la télithromycine et de la céthromycine (ABT 773).....	83
Figure 19. Structure tertiaire des protéines L4 et L22.....	95
Figure 20. Les cinq familles de pompes à efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques.....	101

Liste des tableaux

Tableau 1. Espèces et sous-espèces du genre <i>Legionella</i>	18
Tableau 2. Composition en antibiotiques et antifongiques des milieux BMPA, MWY et GVPC.....	34
Tableau 3. Performances des méthodes diagnostiques de la légionellose.....	40
Tableau 4. Stratégie du choix antibiotique	42
Tableau 5. Schéma d'administration des antibiotiques recommandés en France	43
Tableau 6. Recommandations pour le traitement de la légionellose à l'étranger.....	44
Tableau 7. Concentrations minimales inhibitrices extracellulaires (mg/L) de la rifampicine, des macrolides et des fluoroquinolones pour <i>Legionella</i> spp.	50
Tableau 8. CMIE (mg/L) de la rifampicine, des macrolides et fluoroquinolones pour <i>L. pneumophila</i>	57
Tableau 9. Revue des publications portant sur l'effet des associations d'antibiotiques sur <i>L. pneumophila</i>	62
Tableau 10. Revue des principales études cliniques comparant différentes antibiothérapies dans le traitement de la légionellose.....	66
Tableau 11. Classification des macrolides selon le nombre d'atomes de leur macrocycle... 68	
Tableau 12. Caractéristiques pharmacocinétiques des principaux macrolides.....	70
Tableau 13. Nombre d'opérons de l'ARNr 23S par genre ou espèce bactérienne	73
Tableau 14. Mutations de l'ARNr 23S associées à la résistance aux macrolides.....	87
Tableau 15. Mutations de la protéine ribosomale L4 responsables de résistance aux macrolides.....	96
Tableau 16. Mutations de la protéine ribosomale L22 responsables de résistance aux macrolides.....	98

Liste des annexes

Annexe 1. Composition du milieu de culture BCYE	103
Annexe 2. Composition du milieu PYG utilisé pour l'entretien des amibes	103
Annexe 3. Composition du milieu PAS utilisé pour la co-culture amibienne	103
Annexe 4. Composition du milieu BYE utilisé pour la réalisation d'antibiogramme par microdilution	104

INTRODUCTION

Legionella pneumophila est un pathogène intracellulaire facultatif présent dans les environnements aqueux et capable de provoquer chez l'Homme une pneumopathie sévère, la légionellose. Malgré le développement de techniques diagnostiques fiables et rapides détectant les antigènes bactériens excrétés dans les urines, la mortalité des légionelloses reste supérieure à 10% (données InVS, France, 2012).

Les macrolides constituent les antibiotiques de choix dans les formes modérées de légionellose. Leur association aux fluoroquinolones ou à la rifampicine est recommandée dans les formes sévères de légionellose ou chez l'immunodéprimé (recommandations Afssaps 2011). Au laboratoire de microbiologie, l'antibiogramme n'est quasiment jamais réalisé puisque les souches de *L. pneumophila* sont caractérisées par une sensibilité constante aux antibiotiques *in vitro* et qu'aucune souche résistante n'a été isolée de prélèvements d'origine clinique ou environnementale [1].

Cependant, des échecs thérapeutiques, définis par une absence d'amélioration clinique et par la persistance de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires, sont régulièrement rapportés malgré une antibiothérapie bien conduite. Ce contraste entre observations cliniques et microbiologiques suggère l'existence de mécanismes de résistance *in vivo*.

Dès 1984, Dowling *et al.* ont montré la facilité avec laquelle des mutants résistants à l'érythromycine pouvaient être sélectionnés en un seul passage *in vitro* [2]. En 2000, Nielsen *et al.* présentaient des observations similaires pour les macrolides, mais également pour les fluoroquinolones et la rifampicine, suggérant l'acquisition potentielle d'une résistance aux antibiotiques au décours d'un traitement à l'échelle individuelle [3].

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *L. pneumophila* aux fluoroquinolones et à la rifampicine ont été plus récemment décrits, tandis que ceux impliqués dans sa résistance aux macrolides restent méconnus [4, 5].

L'objectif de notre travail a été d'identifier les mécanismes potentiellement impliqués dans les échecs thérapeutiques sous macrolides chez *L. pneumophila*, afin de développer des outils permettant leur détection. Avant d'exposer nos résultats expérimentaux, une première partie bibliographique sera consacrée à la description des méthodes diagnostiques actuellement disponibles. Nous axerons ensuite notre travail bibliographique sur l'antibiothérapie des légionelloses et, plus particulièrement, sur l'évaluation des bithérapies dans la prise en charge thérapeutique. Enfin, nous développerons plus spécifiquement le sujet sur les macrolides et les mécanismes de résistance aux macrolides actuellement décrits dans la littérature.

1 Rappels sur *Legionella*

Les bactéries du genre *Legionella* sont des bacilles aérobies à Gram négatif, cette coloration restant très faible, intracellulaires facultatifs, non capsulés et non sporulants, mobiles par un ou plusieurs flagelles en position polaire ou latérale.

Mises en évidence par le microbiologiste Joseph McDade en décembre 1976, elles doivent leur nom aux victimes de la tragique épidémie de pneumopathie de Philadelphie, pour la plupart des anciens combattants présents au 58^{ème} congrès de la légion de l'Etat de Pennsylvanie six mois auparavant [6]. Bien que le système de climatisation de l'hôtel où résidaient les congressistes fût suspecté dans cette épidémie, ce n'est qu'en 1982 que la microbiologiste Janet E. Stout mit en évidence la bactérie dans les environnements aqueux, flaques d'eau et systèmes de distribution d'eau des immeubles.

1.1 Taxonomie

Après l'isolement de la bactérie responsable de la maladie des légionnaires, les analyses phénotypiques et génotypiques aboutirent à la création de l'ordre des Legionellales et la famille des *Legionellaceae* [7]. Membres de la sous-classe γ -2 des protéobactéries et seul genre de sa famille, le genre *Legionella* est proche des genres *Coxiella* et *Wolbachia* sur la base des séquences de l'ARN ribosomal 16S [8].

Bien que certains auteurs aient ensuite proposé de diviser la famille en trois genres distincts, *Legionella*, *Fluoribacter* et *Tatlockia* en raison des données de l'hybridation ADN-ADN, seul le genre *Legionella* a été maintenu [9, 10].

Ce genre regroupe plus de 60 espèces et sous-espèces et plus de 70 sérogroupes (Tableau 1). Les espèces nouvellement identifiées sont *L. impletisoli* et *L. yabuuchiae* en 2007, *L. dresdenensis* en 2010, *L. cardiaca*, *L. massiliensis*, *L. tunisiensis*, *L. nagasakiensis* et *L. steelei* en 2012 [11-15].

Les espèces *L. lytica*, *L. drozanski*, *L. rowbothamii*, *L. drancourtii* et *L. fallonii*, initialement décrites comme des légionelles à développement intracellulaire strict ou *Legionella-like amoebal pathogens* (LLAPs), ont été axénisées [16-18].

Une trentaine d'espèces de *Legionella* a été isolée en pathologie humaine. Parmi elles, *L. pneumophila* séro groupe 1 est rapportée dans 85 à 90% des cas pour lesquels une souche a été isolée en Europe et aux Etats-Unis [19, 20].

Tableau 1. Espèces et sous-espèces du genre *Legionella*

Espèces décrites en pathologie humaine	Espèces uniquement décrites dans les environnements aqueux
<i>L. anisa</i>	<i>L. adelaidensis</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. busanensis</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. beliardensis</i>
<i>L. cardiaca</i>	<i>L. brunensis</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. cherrii</i>
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. drancourtii</i>
<i>L. feeleeii</i>	<i>L. dresdenensis</i>
<i>L. gormanii</i>	<i>L. drozanskii</i>
<i>L. hackeliae</i>	<i>L. erythra</i>
<i>L. jordani</i>	<i>L. fairfieldensis</i>
<i>L. lansingensis</i>	<i>L. fallonii</i>
<i>L. londiniensis</i>	<i>L. geestiana</i>
<i>L. longbeachae</i>	<i>L. genomospecies</i>
<i>L. maceachernii</i>	<i>L. gratiana</i>
<i>L. micdadei</i>	<i>L. gresilensis</i>
<i>L. nagasakiensis</i>	<i>L. jamestowniensis</i>
<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. impletisoli</i>
<i>L. parisiensis</i>	<i>L. israelensis</i>
<i>L. pittsburghensis</i>	<i>L. lytica</i>
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	<i>L. massiliensis</i>
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	<i>L. moravica</i>
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	<i>L. nautarum</i>
<i>L. rubrilucens</i>	<i>L. pittsburghensis</i>
<i>L. sainthelensi</i>	<i>L. quateirensis</i>
<i>L. steelei</i>	<i>L. quinlivanii</i>
<i>L. tucsonensis</i>	<i>L. rowbothamii</i>
<i>L. wadsworthii</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. waltersii</i>	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. worsleiensis</i>	<i>L. spiritensis</i>
	<i>L. steigerwaltii</i>
	<i>L. taurinensis</i>
	<i>L. tunisiensis</i>
	<i>L. yabuuchiae</i>

1.2 Habitat

1.2.1 Ecosystèmes naturels

Le réservoir environnemental naturel des légionelles est extrêmement varié : lacs, étangs, rivières... où elles sont détectées respectivement dans plus de 40% des cas par culture et plus de 80% des cas par PCR [21]. Ces environnements naturels restent cependant rarement associés à des infections car les conditions pour une croissance considérable des légionelles y sont peu favorables. Récemment, Sakamoto *et al.* ont identifié les flaques d'eau en bordure de routes comme de potentielles sources de contamination en saison chaude puisqu'ils y retrouvaient des *Legionella* par culture dans 35% des cas [22].

Le sol et les composts constituent également un réservoir naturel pour de nombreuses espèces [23, 24]. Les légionelloses dues à *Legionella longbeachae* ayant pour source de contamination des composts de plantes sont régulièrement décrites, en particulier en Australie et en Nouvelle-Zélande [25, 26].

Les écosystèmes naturels sont cependant rarement identifiés comme source d'infection humaine.

1.2.2 Ecosystèmes artificiels

C'est en créant des écosystèmes artificiels que l'Homme réunit les conditions favorables à une prolifération bactérienne importante : température comprise entre 25 et 45°C, pH situé entre 5,5 et 8,5, fortes concentrations en matières organiques et inorganiques comme le fer, présence de protozoaires, corrosion, tartre, bras morts et boucles entraînant une stagnation de l'eau et favorisant la formation de biofilms bactériens...[27-30].

Les légionelles colonisent et prolifèrent dans les installations sanitaires (chauffe-eaux, douches, robinets...), les dispositifs de climatisation et de refroidissement (tours aéroréfrigérantes, circuits de refroidissement industriel...), les bains bouillonnants, bassins, fontaines décoratives, etc....

Le risque domestique est probablement lié à un nombre considérable d'infections sporadiques [31].

1.2.3 Rôle des protozoaires dans la persistance de *Legionella* dans l'environnement

La réplication intracellulaire de *L. pneumophila* a été décrite pour la première fois par Rowbotham en 1980 dans les amibes des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* [32].

Les légionelles sont considérées comme des bactéries « résistantes » aux protozoaires : ciliés et amibes, d'où le terme d'*amoeba-resistant bacteria* (ARB). Une fois phagocytées, les légionelles ne sont pas détruites mais survivent et se multiplient au détriment de la cellule hôte. Les amibes fournissent donc à *Legionella* un environnement intracellulaire permettant sa multiplication et le maintien de sa virulence et elles peuvent ainsi être comparées à un cheval de Troie [33]. Le cycle cellulaire des légionelles dans les amibes est remarquablement proche de celui observé dans les macrophages que nous décrivons plus loin [34-37].

Les conséquences de cette interaction amibes – légionelles du point de vue de la pathogénie de *Legionella* sont multiples.

Les amibes constituent le site de multiplication privilégié des légionelles dans l'environnement. Plus d'une vingtaine d'espèces d'amibes et de ciliés permettant la survie et la multiplication de *Legionella* ont été identifiées : *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Hartmanella vermiformis*, *Naegleria* spp, *Echinamoeba* spp, *Vahlkampfia* spp, *Saccamoeba* spp, *Willaertia* spp, et le genre *Tetrahymena* pour les ciliés. Les genres *Acanthamoeba*, *Hartmanella* et *Naegleria* sont les plus fréquemment associés aux légionelles contaminant les réseaux d'eau [38, 39].

Les amibes protègent *Legionella* et lui permettent de résister davantage aux stress environnementaux : biocides, désinfectants, températures extrêmes, dessiccation, ce qui constituerait un moyen de (re)colonisation rapide des réseaux d'eau [40]. La formation de kystes amibiens renforcerait ce phénomène de protection, bien que la présence de *Legionella* au sein de ces formes kystiques n'ait pas été démontrée jusqu'à présent [41].

De plus, dans des conditions hostiles (chaleur, hypochlorite de sodium, absence de nutriments...), les légionelles peuvent entrer dans un état de « dormance ». Ces formes bactériennes viables mais non cultivables (VBNC, *viable but non culturable*) peuvent retrouver leur cultivabilité par les amibes qui vont leur restituer leur phénotype de bactéries cultivables et potentiellement virulentes [41-43].

Enfin, les amibes favorisent l'acquisition de virulence des légionelles. Au cours de la multiplication intra-amibienne, les légionelles alternent entre une forme répliquative et une forme infectieuse contenue dans des vésicules. Ces vésicules infectieuses apparaissent dans les amibes (et à moindre degré dans les macrophages) et pourraient représenter la forme vectrice de l'infection à légionelles [44]. Les légionelles issues d'une multiplication intracellulaire ont été décrites comme plus virulentes pour la réinfection de cellules hôtes en comparaison à des bactéries cultivées sur milieux gélosés. *L. pneumophila*, après s'être multipliée dans des amibes, devient 10 à 100 fois plus infectieuse pour les amibes et les macrophages murins, et 100 à 1000 fois plus pour les monocytes humains et les cellules

épithéliales [45]. Chez des modèles murins, la virulence des légionelles est accrue lorsqu'elles sont co-inoculées avec des amibes [46].

Bien qu'aucune étude n'ait démontré de corrélation quantitative directe, la présence de légionelles dans les écosystèmes aqueux semble intimement liée à celle des amibes. Une revue récente de Loret *et al.* montre que, selon les études, 43 à 100% des écosystèmes aqueux (rivières, lacs, étangs, ruisseaux, réservoirs, eaux souterraines...) contiennent des amibes libres avec des concentrations supérieures dans les eaux de surface [39]. La biodiversité des amibes ne présente pas de différence significative en termes de nature de l'écosystème et d'origine géographique et les genres amibiens connus comme étant des hôtes potentiels pour *Legionella* sont retrouvés dans tous les sites étudiés. La température de l'eau, la présence de matières organiques et de biofilms affecte la biodiversité et les concentrations amibiennes dans ces milieux. Par ailleurs, dans les systèmes de production et de distribution d'eau potable, Thomas *et al.* ont montré que la densité et la diversité amibienne se développaient tout au long des réseaux de traitement et de distribution d'eau. Les amibes infectées par des ARB étaient retrouvées principalement à partir des eaux filtrées, suggérant que les biofilms favoriseraient le contact entre les amibes et les ARB [47]. Ces observations sont corrélées avec celles de Berk *et al.* qui rapportent que les amibes sont plus fréquemment infectées dans les tours aéro-réfrigérantes que dans l'environnement naturel (55% versus 7,5%) et suggèrent que des conditions artificielles pourraient favoriser les interactions légionelles – amibes [48].

Les ciliés du genre *Tetrahymena* vivent à des températures modérées, entre 20 et 25°C. Elles sont moins favorables à la multiplication des légionelles que les amibes du genre *Hartmannella*, les plus retrouvées dans les eaux chaudes sanitaires car supportant des températures plus hautes [49, 50]. Au sein de l'espèce d'amibes *Willaertia magna*, Dey *et al.* ont montré qu'il existait des différences en terme de multiplication intracellulaire entre différentes souches de *L. pneumophila* sérotype 1 [51].

Inversement, les légionelles présentent une certaine spécificité d'hôte amibien et/ou ciliaire, et *in vitro* chaque espèce est limitée dans le type d'amibes ou de ciliés qu'elle peut infecter. En 1990, Fields *et al.* ont montré que *L. anisa* ne pouvait se multiplier dans *Tetrahymena* spp. [52]. Dans l'étude de Neumeister *et al.*, *L. anisa*, *L. longbeachae* sérotype 1 et *L. jordanis* ne se multipliaient pas dans *Acanthamoeba castellanii* [53]. Il apparaît également que *L. pneumophila* est l'espèce possédant le spectre d'hôte le plus important. Cependant, au sein de cette espèce, Buse *et al.* ont récemment montré des croissances variables en fonction de la souche de *L. pneumophila* et de la température d'infection des amibes (24°C,

32°C, 37°C, 41°C) [54]. Ces données indiquent que les stratégies futures de prévention des légionelloses devront inclure des mesures efficaces contre les amibes.

1.3 Pouvoir pathogène

1.3.1 Modes de contamination

Le seul mode de contamination démontré à ce jour est le mode aérien. L'Homme s'infecte par inhalation d'aérosols contaminés par *Legionella*. Les bactéries atteignent ainsi les alvéoles pulmonaires et infectent les macrophages alvéolaires et les pneumocytes.

L'eau potable, domestique et hospitalière, est souvent mise en cause en raison des aérosols émis par les douches, les lavabos, les humidificateurs... [55-57]. Des contaminations à partir de spas ont également été décrites dans la littérature [58, 59].

Une association étroite avec des précipitations entraînant une augmentation de l'humidité 6 à 14 jours avant les cas de légionellose a été observée dans plusieurs études [60, 61]. Ces données sont corrélées avec celles de Sakamoto *et al.* suggérant des contaminations par des écosystèmes naturels après des précipitations [22].

Des cas de légionellose à *L. pneumophila* séro groupe 3 et 6 après des noyades dans des eaux de spa ont été décrites [62-64].

Si la corrélation entre le contact avec le terreau et l'infection par *L. longbeachae*, responsable de la majorité des cas en Australie et en Nouvelle-Zélande, est clairement établie, le mode de contamination par inhalation reste non démontré [25, 26].

Enfin, aucun cas de transmission interhumaine n'a été rapporté ce qui ne justifie aucun isolement respiratoire pour les patients infectés.

1.3.2 Réplication intracellulaire

Les légionelles pénètrent dans la cellule soit (i) par phagocytose conventionnelle qui chez les macrophages fait intervenir les facteurs du complément (C1 et C3) et les protéines de type Momp (*major outer membran protein*), soit (ii) par *coiling phagocytose* ou phagocytose par enroulement assez typique des légionelles, au cours de laquelle la cellule hôte vient enrouler la bactérie grâce à un pseudopode [65, 66].

Lorsqu'une particule inerte est phagocytée, elle se retrouve dans une vacuole qui subit une maturation pour devenir un phagolysosome dont le contenu est dégradé. Les pathogènes intracellulaires utilisent des stratégies variées afin d'éviter la maturation de la vacuole en phagolysosome qui leur serait fatale. Ils favorisent ainsi l'élaboration d'une niche de survie et de réplication. Certaines de ces stratégies consistent à lyser la vacuole avant sa maturation

permettant une multiplication dans le cytoplasme (*Trypanosoma cruzi*, *Listeria*, *Shigella* et *Rickettsia*), ou à arrêter le processus de maturation de la vacuole (*Mycobacterium*, *Salmonella Typhimurium*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Leishmania* spp.), ou encore bloquer la voie endocytaire (*Legionella*, *Chlamydia*, *Brucella*, *Toxoplasma gondii*) [67].

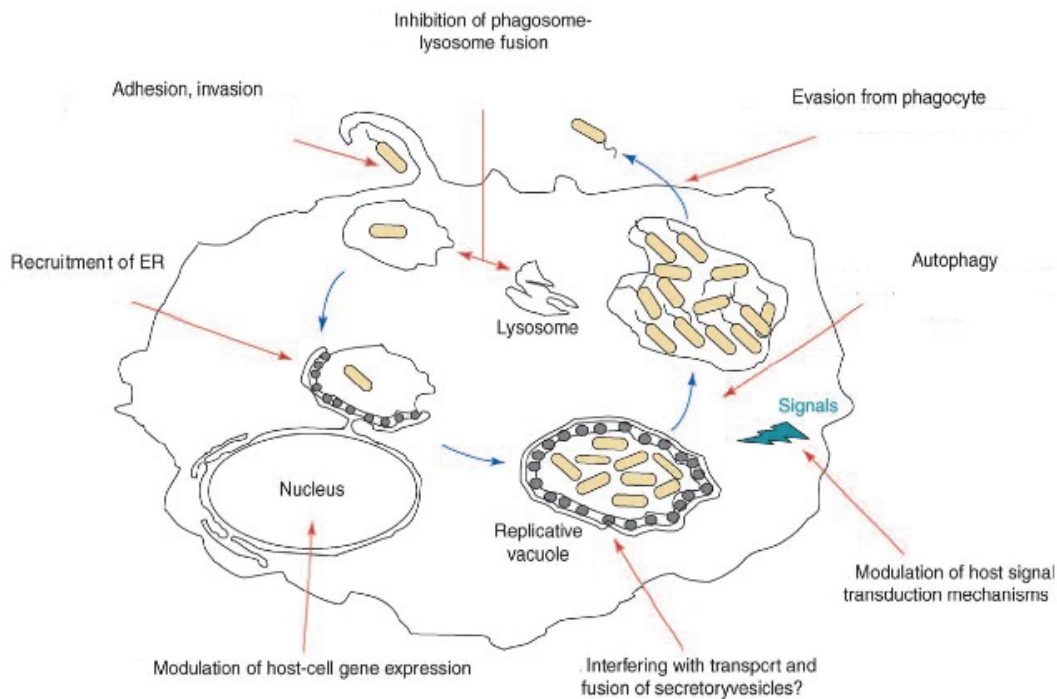


Figure 1. Cycle intracellulaire de *L. pneumophila*.

Le cycle intracellulaire de *Legionella* peut être résumé ainsi (Figure 1) [35 , 44, 68 , 69 , 70 , 71] :

- adhérence aux cellules hôtes et internalisation (après 5 minutes et jusqu'à 2 heures) ;
- inhibition de la fusion phagolysosomale : une fois phagocytée, *Legionella* évite les interactions avec la voie d'endocytose ; l'échappement à la voie endocytaire permet à *Legionella* de retarder la fusion phagolysosomale ; ce délai permet à la bactérie de devenir acido-résistante et ainsi de résister secondairement au contenu lysosomal acide ;
- recrutement d'organites dont le réticulum endoplasmique (RE) rugueux (après 4 à 10 heures) : la vacuole s'associe séquentiellement avec les mitochondries et le réticulum endoplasmique puis se positionne dans la région périnucléaire entourée de ribosomes ; cette vacuole de réplication présente des similarités avec les autophagosomes suggérant un mécanisme d'autophagie induit par *Legionella* ; l'autophagie constitue une voie majeure de

catabolisme lysosomal conservée au cours de l'évolution des eucaryotes. Elle correspond à la phagocytose de composés cytosoliques par le RE et peut se résumer en 3 étapes : formation d'une vacuole autophagique initiale (autophagosome) qui séquestre le matériel cytoplasmique, maturation de l'autophagosome en vacuole dégradative, et fusion avec le lysosome ;

- réplication intracellulaire dans le phagosome (après 12 à 18 heures) ;
- lyse de la cellule hôte par apoptose ou nécrose et relargage des bactéries (après 18 à 24 heures).

Au cours du cycle intracellulaire les bactéries passent d'une forme multiplicative immobile (aflagellée) [71] à une forme non multiplicative appelée forme infectieuse ou transmissible (flagellée). Les formes infectieuses se caractérisent par une meilleure résistance aux conditions environnementales et une expression accrue des gènes de virulence [44, 69].

Si les étapes d'adhérence des légionelles aux cellules hôtes et de libération des bactéries après lyse de ces cellules présentent des différences entre les amibes et les macrophages, la plupart des gènes impliqués dans la multiplication intracellulaire des *Legionella* dans ces deux types cellulaires semblent être les mêmes [35, 68].

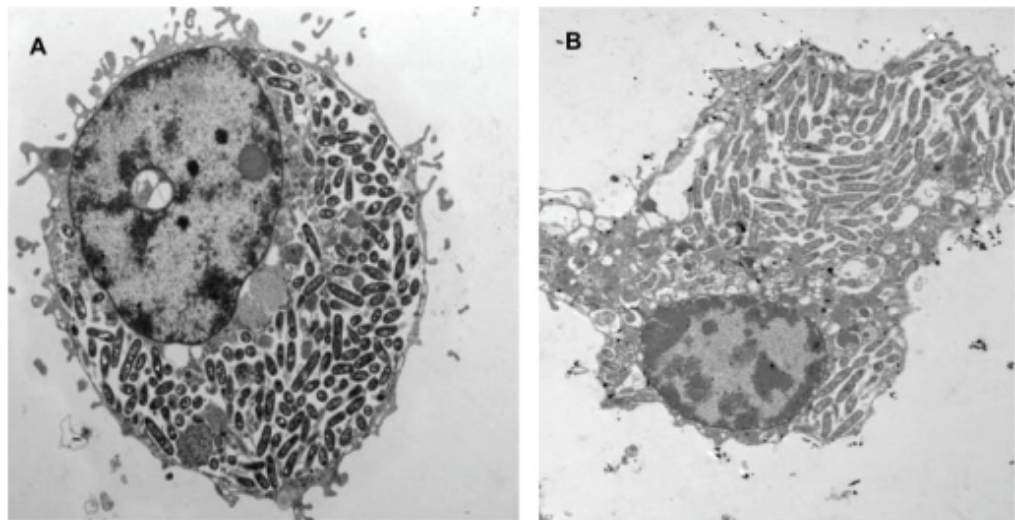


Figure 2. Macrophages U937 (A) et *Acanthamoeba polyphaga* (B) infectées par *L. pneumophila* à 24 heures, d'après Molmeret *et al.* [37].

L'infection est très similaire dans les deux types de cellules. On retrouve *Legionella* dans le cytoplasme 24 heures après l'infection.

1.3.3 Place de *Legionella* dans les pneumopathies aiguës

Les pneumopathies aiguës communautaires représentent la majorité des infections aiguës nécessitant une hospitalisation. Parmi les agents étiologiques, la fréquence de *Legionella* est diversement appréciée, variant de 0,5% à plus de 10% selon les auteurs. Si la place de *Legionella* dans les formes bénignes communautaires est controversée, *Legionella* est clairement identifiée comme un agent de pneumopathie sévère. Dans plusieurs études, *Legionella* arrive en seconde position après *Streptococcus pneumoniae* pour les patients nécessitant une hospitalisation [72]. La revue de Woodhead *et al.* identifie *Legionella* comme l'agent causal chez 1,9% des patients ambulatoires, 4,9% des patients hospitalisés et 7,9% des patients admis en service de réanimation [73].

En France, les données issues de la déclaration obligatoire de 2012 font état de 1300 cas notifiés soit un taux d'incidence de $2/10^5$ habitants. Le développement de tests de diagnostic rapide permettant la détection des antigènes urinaires de *L. pneumophila* sérotype 1 a largement favorisé le diagnostic des légionelloses (Figure 3). La place de *L. pneumophila* sérotype 1 comme principal pathogène (plus de 85% des cas) est décrite dans de multiples études [19, 20, 74]. Néanmoins, le diagnostic des autres sérotypes et espèces de légionelles est potentiellement sous-estimé du fait des tests commercialisés qui détectent préférentiellement *L. pneumophila* sérotype 1.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'Australie et la Nouvelle-Zélande présentent une particularité avec *L. longbeachae* qui représente une espèce prédominante.

Depuis quelques années, plusieurs laboratoires européens de référence (Autriche, Allemagne, Danemark, Royaume-Uni) ont diagnostiqué des cas de co-infection à *Legionella* chez un même patient : co-infection par différentes espèces, différents sérotypes de *L. pneumophila* ou différentes souches au sein de *L. pneumophila* sérotype 1 [75]. Ces données suggèrent qu'il pourrait s'avérer utile d'identifier plusieurs colonies isolées par culture pour un même patient afin de préciser l'incidence encore inconnue de ces co-infections. Sur un plan épidémiologique, cela permettrait d'améliorer l'identification des sources d'infection.

Enfin, des études sérologiques suggèrent que les LLAPs pourraient potentiellement être responsables d'infections humaines, principalement comme agents de co-infection [76].

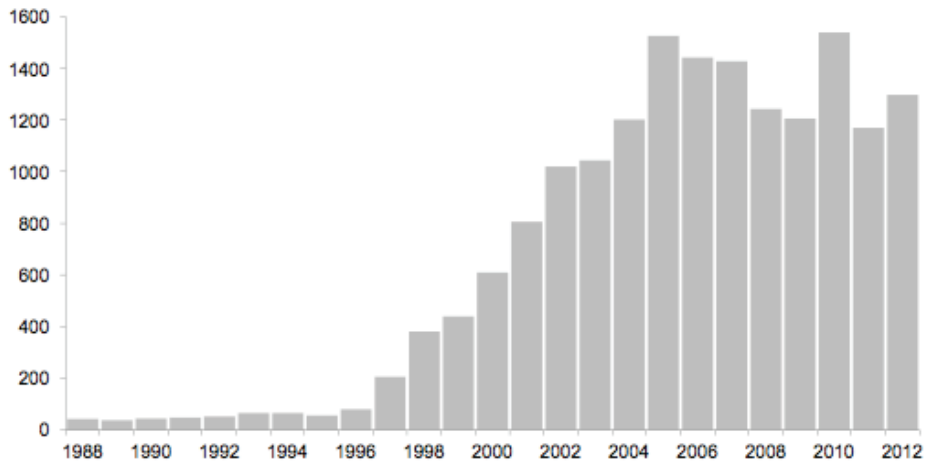


Figure 3. Evolution du nombre de cas de légionellose en France, 1988-2012 (données InVS).

1.4 Diagnostic clinique et radiologique

Le terme légionellose regroupe trois entités cliniques distinctes : la maladie des légionnaires, les formes extra-pulmonaires et la fièvre de Pontiac. En pratique, le terme « légionellose » est réservé à la maladie des légionnaires.

1.4.1 La légionellose ou maladie des légionnaires

Le diagnostic de légionellose est porté sur l'existence d'une pneumopathie clinique confirmée radiologiquement, de gravité variable.

Après une incubation de 2 à 10 jours, le tableau clinique s'installe de façon progressive en 2 à 3 jours. L'échec d'un traitement probabiliste par β -lactamines peut être évocateur d'une légionellose [77-79].

Les études de Sopena *et al.* montrent qu'en comparaison avec les pneumopathies à *Streptococcus pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*, les légionelloses sont associées à des troubles neurologiques (céphalées, confusions) dans 30% des cas et à des troubles digestifs (diarrhées) dans 25% des cas. Une toux, des expectorations et des douleurs thoraciques sont moins fréquemment décrites qu'avec les autres pathogènes respiratoires [77, 80]. En comparaison avec les pneumopathies à pneumocoque, on identifie également une fièvre plus élevée, fréquemment supérieure à 39°C, et une incidence supérieure des bradycardies [78, 81]. Un épanchement pleural est observé chez un tiers des patients. L'intensité des douleurs thoraciques et l'apparition d'un épanchement pleural sont inversement corrélées à la rapidité de l'initiation d'une antibiothérapie adéquate [79].

Sur le plan biologique, on retrouve une hyponatrémie, une élévation des créatine kinases, des LDH et des ASAT (retrouvée également dans les pneumonies à *Chlamydia pneumoniae*) [77, 80]. Une hypophosphatémie et une hypoplaquettose sont également évocatrices d'une légionellose [81-83].

De nombreuses études ont tenté d'identifier les critères permettant de différencier la légionellose des autres pneumopathies [78, 80, 84-87]. Un système de score permettant un diagnostic présomptif de légionellose à l'admission a été proposé sur la base de critères cliniques, épidémiologiques et biologiques par Cunha *et al.* en 1998 [87]. Ce score WUH (*Winthrop University Hospital*) a été évalué par Gupta *et al.* qui ont montré qu'il était sensible (78 à 87%) mais non spécifique [88]. Un second score, le CBPIS (*Community-Based Pneumonia Incidence Study*) testé par Fernández-Sabé *et al.* présentait une sensibilité de 96% mais une spécificité de 17%. Ces systèmes de score manquent ainsi de fiabilité ce qui en limite leur utilisation.

Une étude plus récente suggère qu'un ratio protéine C réactive / procalcitonine (CRP/PCT) inférieur à 0,5 serait indicatif d'une pneumopathie à pneumocoque tandis qu'un ratio supérieur à 1,25 orienterait vers une légionellose [89]. Un autre étude a montré que les patients atteints de légionellose présentaient un taux élevé de néoptérine (produite par les monocytes/macrophages après induction par l'IFN- γ et généralement augmentée dans les infections à germes intracellulaires) et un taux modérément élevé de PCT. Cependant, le calcul du ratio néoptérine/PCT ne semble pas suffisant pour exclure une pneumopathie à pneumocoque [84].

Les examens d'imagerie pulmonaire montrent une atteinte mono ou bilatérale, généralement non systématisée, asymétrique, alvéolaire ou alvéolo-interstitielle. La radiographie ne peut distinguer les pneumonies à *Legionella* des pneumonies à étiologie bactérienne autre, comme par exemple le pneumocoque [81].

1.4.1.1 Complications

La légionellose peut se compliquer d'une insuffisance respiratoire et/ou rénale et d'une rhabdomyolyse. La constitution d'abcès pulmonaires constitue une complication rare retrouvée quasi exclusivement chez des patients immunodéprimés (cancer, hémopathie, traitement par corticoïdes, patient greffé, HIV) ou présentant une pathologie auto-immune [90-92].

Des manifestations chroniques à type d'asthénie, de symptômes neurologiques et neuromusculaires ont été décrites après une épidémie en Hollande survenue en 1999 lors

d'une exposition florale [93]. Cependant, l'implication directe de la légionellose sur ces symptômes n'a pas été démontrée.

1.4.1.2 Mortalité des légionelloses

Le taux de mortalité rapporté par la surveillance des cas en France en 2012 était de 11% (données InVS). Ce taux, stable depuis une dizaine d'année, reste relativement élevé malgré une prise en charge améliorée par le développement de tests urinaires permettant un diagnostic rapide. Les données de la littérature rapportent un taux de mortalité variant de 5 à 33% pour les patients hospitalisés en réanimation [94, 95].

Le statut immunitaire constitue un facteur pronostique, plusieurs études récentes rapportant une mortalité supérieure à 25% chez les patients immunodéprimés [96, 97].

De plus, le taux de mortalité est corrélé au délai d'instauration d'une antibiothérapie adéquate [98]. Une étude française portant sur 540 cas a identifié également l'âge, le sexe féminin, la corticothérapie, l'apparition d'une insuffisance rénale et une CRP>500 mg/L comme des facteurs de mauvais pronostic [99].

1.4.1.3 Facteurs de risque individuels

Des facteurs individuels peuvent induire une sensibilité accrue au risque d'infection [74, 77, 79, 100] :

- l'âge supérieur à 50 ans, l'âge médian retrouvé dans la plupart des études se situant autour de 60 ans ; notons que les cas de légionellose restent rares chez les sujets jeunes et exceptionnels en pédiatrie [101] ;
- le sexe masculin (75% des cas) ;
- le tabagisme (45% des cas) ;
- le diabète (15% des cas) ;
- les pathologies chroniques cardiaques et/ou pulmonaires, l'insuffisance rénale ;
- les traitements par anti-TNF [102].

Selon les études, l'alcoolisme est identifié ou non comme un facteur de risque.

Enfin, le statut immunitaire du patient constitue un facteur de risque clé. Sont considérés comme sujets à haut risque les immunodéprimés sévères et en particulier ceux présentant une greffe d'organe ou de moelle osseuse ou une corticothérapie prolongée.

Sont considérées à risque les personnes ayant un système immunitaire altéré du fait d'une pathologie telle qu'une hémopathie maligne, une maladie du greffon contre l'hôte, un cancer, ou d'un traitement immunosuppresseur.

Cependant, des cas sévères de légionellose ont été décrits chez des sujets ne présentant aucun facteur de risque. Il existerait une susceptibilité génétique individuelle liée aux récepteurs impliqués dans l'immunité innée anti-bactérienne, les *toll-like receptors* (TLR). En effet, plusieurs auteurs ont montré que des polymorphismes des TLR2, TLR4 et TLR5 pouvaient influencer la susceptibilité de l'hôte au développement intracellulaire des *Legionella* [103-106].

1.4.2 Manifestations extra-pulmonaires

Les localisations extra-pulmonaires sont très rares. Probablement secondaires à une bactériémie à *Legionella*, elles surviennent de façon concomitante ou à distance de l'épisode de pneumopathie et surtout chez l'immunodéprimé.

Selon les atteintes, le diagnostic peut être réalisé directement par culture, PCR, ou détection d'une antigénurie positive, et indirectement par sérologie.

Les formes suivantes ont été décrites sous formes de *case reports* :

- localisations neurologiques : méningo-encéphalite [107], abcès cérébraux [108, 109] ;
- localisations cardiaques : endocardites sur valve native ou prothétique [12, 109-111], myocardite et péricardite [112] ;
- localisations cutanées : cellulite [113-115], abcès [115, 116] ;
- localisations articulaires : arthrites [117, 118], infections sur prothèse [119] ;
- localisations musculaires à type de myosite [120] ;
- localisations digestives : abcès péri-rectaux [121], péritonite [122], colite [123], pancréatite aiguë [124].

Des manifestations cutanées érythémateuses, pétéchiales et maculo-papuleuses peuvent être observées au décours d'une légionellose [125, 126].

1.4.3 Fièvre de Pontiac

La fièvre de Pontiac se présente comme un syndrome pseudo-grippal. Elle ne s'accompagne pas de pneumonie et ne met pas en jeu le pronostic vital. La guérison est habituellement obtenue en 2 à 8 jours [127]. Son taux d'attaque est de 95%, tandis que celui de la légionellose est estimé entre 0,1 à 5%.

Son diagnostic biologique ne peut être réalisé que rétrospectivement par sérologie. Il est exceptionnellement réalisé.

1.5 Diagnostic biologique

Les examens microbiologiques apportent la certitude diagnostique. Les critères de déclaration obligatoire associent une pneumopathie à au moins un des critères microbiologiques suivants (Figure 4) :

- cas confirmé : isolement de *Legionella* spp. et/ou présence d'antigène soluble urinaire et/ou augmentation du titre d'anticorps (x4) avec un deuxième titre minimum de 128 ;
- cas probable : titre unique d'anticorps élevé (≥ 256) et/ou PCR positive.

Depuis 2011, l'immunofluorescence directe ne fait plus partie des critères diagnostiques des cas probables. Elle a été remplacée par la PCR qui figurait déjà dans les critères européens de définition de cas.

1.5.1 Anomalies non spécifiques

Nous avons vu précédemment (paragraphe 1.4.1) que de nombreuses anomalies biologiques non spécifiques étaient fréquemment observées dans les légionelloses :


- anomalies biochimiques : hyponatrémie, hypophosphorémie, élévation des créatine-kinases, des LDH et des ASAT, hypoxémie proportionnelle au degré d'atteinte pulmonaire, élévation de la créatinémie proportionnelle au degré d'atteinte rénale ;
- anomalies de l'hémogramme : hypoplaquettose, hyperleucocytose ou leucopénie dans les formes sévères.

1.5.2 Détection des antigènes urinaires

La mortalité des légionelloses impose un diagnostic rapide d'autant plus qu'un retard de diagnostic est associé à une mortalité accrue [98]. Les antigènes de nature lipopolysaccharidique sont excrétés précocement (dans les trois premiers jours suivant l'apparition des symptômes) [128]. La durée de l'excrétion est variable selon les patients : de quelques jours à 40 jours en moyenne, et jusqu'à plus d'un an chez les patients immunodéprimés [128, 129]. Elle est inchangée lors d'un traitement antibiotique.

Le premier test de détection des antigènes solubles de *Legionella* dans les urines, un test ELISA, a été développé dans les années 1970 [130]. De nombreux tests immunochromatographiques ou EIA ont ensuite été commercialisés et ont démontré leur apport dans le diagnostic et la prise en charge des cas de légionellose. Ils permettent d'établir un diagnostic en 1 à 4 heures.

République française

Médecin ou biologiste déclarant (tampon) Nom : _____ Hôpital/service : _____ Adresse : _____ Téléphone : _____ Télécopie : _____ Signature : _____	Si notification par un biologiste Nom du clinicien : _____ Hôpital/service : _____ Adresse : _____ Téléphone : _____ Télécopie : _____	Maladie à déclaration obligatoire  Légionellose 12202 Important : cette maladie justifie une intervention urgente locale, nationale ou internationale. Vous devez la signaler par tout moyen approprié (téléphone, télécopie...) au médecin de l'ARS avant même confirmation par le CNR ou envoi de cette fiche.
---	--	---

Initiale du nom : Prénom : Sexe : M F Date de naissance : _____

Code d'anonymat : _____ (A établir par l'ARS) Date de la notification : _____

Code d'anonymat : _____ (A établir par l'ARS) Date de la notification : _____

Sexe : M F Année de naissance : _____ Code postal du domicile du patient : _____

Signes cliniques :

Date des 1^{ers} signes cliniques : _____

Date d'hospitalisation : _____

Signes cliniques évocateurs de pneumopathie : oui non

Pneumopathie confirmée radiologiquement : oui non

Evolution : guérison encore malade décès

Si décès, date : _____

Légionellose	
Critères de notification : pneumopathie associée à au moins un des résultats suivants : Cas confirmé : 1. isolement de <i>Legionella spp.</i> 2. augmentation du titre d'anticorps (x4) avec un 2 ^e titre minimum de 128 3. présence d'antigène soluble urinaire Cas probable : 4. titre d'anticorps élevé (≥256) 5. PCR positive	

Confirmation du diagnostic :

	Pos	Nég	Non effectué	En cours
Culture	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antigène soluble urinaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PCR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sérologie

	1 ^{er} prélèvement	2 ^e prélèvement
Date :	_____	_____
Titre 1 :	_____	_____

Espèce/sérogroupe : *L. pneumophila* sérogroupe 1 autre espèce, préciser :
 L. pneumophila autre sérogroupe, préciser : en cours

Facteurs favorisants : hémopathie ou cancer corticothérapie autres immunosuppresseurs
 tabagisme diabète autres, préciser :

Exposition à risque (dans les 10 jours précédant les premiers signes de légionellose) : **indiquer précisément les lieux d'exposition, types d'hébergements (ville, pays) et adresse** (si nécessaire, détails sur une feuille jointe)

	Oui	Non		Période	Etablissement :
Hôpital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du _____	au _____	Service :
Maison de retraite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du _____	au _____	Ville :
Station thermale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du _____	au _____	Préciser :
Hôtel, camping, voyage...	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du _____	au _____
Piscine, jacuzzi...	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du _____	au _____
Autre exposition (loisirs, professionnelle...)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du _____	au _____

Notion de cas groupés (cas liés aux mêmes lieux d'exposition) :

oui non Si oui, préciser :

Médecin ou biologiste déclarant (tampon) Nom : _____ Hôpital/service : _____ Adresse : _____ Téléphone : _____ Télécopie : _____ Signature : _____	Si notification par un biologiste Nom du clinicien : _____ Hôpital/service : _____ Adresse : _____ Téléphone : _____ Télécopie : _____	ARS (signature et tampon) _____ _____
---	--	--

Maladie à déclaration obligatoire (Art L 3113-1, R 3113-1, R 3113-2, R 3113-5, D 3113-7 du Code de la santé publique)
 Information individuelle des personnes - Droit d'accès et de rectification pendant 6 mois par le médecin déclarant (loi du 6 janvier 1978) - Centralisation des informations à l'Institut de veille sanitaire

Figure 4. Fiche de notification des cas de légionellose (www.invs.sante.fr).

Les performances de cette méthode sont dépendantes des kits commercialisés. Une concentration préalable des urines permet d'améliorer la sensibilité de ces tests [131-134]. La sensibilité des tests immuno-chromatographiques, tous confondus, varie de 31,5 à 91,8% selon les études. Le test Binax NOW® *Legionella* (Alere) est généralement considéré comme le « gold standard » en raison de ses meilleures performances : sensibilité comprise entre 77% et 92% selon les études, spécificité > 99% [131, 135-138]. Les tests EIA (Bartels, Biotest, Binax) présentent une meilleure sensibilité que les tests immuno-chromatographiques mais nécessitent un temps supérieur aux tests immuno-chromatographiques [132, 139].

Toutes les études montrent une meilleure sensibilité pour *L. pneumophila* séro groupe 1 que pour les autres sérogroupes ou les autres espèces [139-141]. Parmi *L. pneumophila* séro groupe 1, les souches ne possédant pas un certain épitope, l'épitope Mab3/1 (voir partie 1.5.3.3) [142], sont également moins bien détectées [139].

La sensibilité de ces tests varie également en fonction de la sévérité de la légionellose. Lors d'une épidémie aux Pays-Bas, Yzerman *et al.* ont montré une sensibilité de 40 à 53% (3 kits utilisés) pour les formes modérées, alors que cette sensibilité atteignait 88 à 100% pour les formes sévères.

Cette sensibilité est enfin diminuée dans les légionelloses nosocomiales, où la fréquence des infections dues à *L. pneumophila* séro groupe 1 Mab3/1 négative, à des sérogroupes 2-14 ou à d'autres espèces est accrue [143].

Du fait de la faible fréquence des légionelloses, il est nécessaire que ces tests disposent d'une excellente spécificité. Les réactions croisées décrites sont exceptionnelles pour le test Binax NOW® *Legionella*. Une réaction croisée a été identifiée chez un patient ayant reçu une injection de sérum anti-lymphocytaire (SAL) de lapin après une greffe rénale [144]. Les anticorps anti-lapin développés par le patient receveur de SAL se lient aux anticorps de lapin anti-*Legionella* présents dans le test. Pour toute antigénurie positive, il est donc recommandé de tester à nouveau les urines après un chauffage de 5 minutes à 100°C qui permet de déprotéiniser l'échantillon mais n'altère pas l'antigène lipopolysaccharidique de *Legionella*. Pour les tests nouvellement mis sur le marché, il est important de caractériser leur spécificité, des réactions croisées étant parfois observées sans que l'origine n'en soit déterminée.

1.5.3 Culture sur milieu axénique

L'existence de porteurs sains n'ayant pas été démontrée jusqu'à présent, l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements cliniques affirme le diagnostic de légionellose. La

culture est considérée comme le « gold standard » car elle permet d'isoler les souches cliniques et de procéder aux enquêtes épidémiologiques.

1.5.3.1 Prélèvements

La culture peut être réalisée à partir de tout type de prélèvement respiratoire : expectoration, aspiration trachéo-bronchique, lavage broncho-alvéolaire, biopsie pulmonaire, liquide pleural. Néanmoins, de nombreux patients ne présentent pas de toux productive ce qui impose d'utiliser une méthode invasive pour recueillir un prélèvement clinique [145]. Les prélèvements contenant beaucoup de cellules épithéliales et peu de polynucléaires, normalement rejetés en bactériologie conventionnelle, doivent être ensemencés pour la recherche de légionelles [146].

D'autres prélèvements peuvent être mis en culture dans des contextes cliniques plus particuliers : sang, tissus, biopsies et liquides divers en cas de suspicion de localisations extra-pulmonaires par exemple.

Lorsque la culture ne peut être réalisée immédiatement après réception au laboratoire, les prélèvements doivent être mis en sécurité à +4°C, afin d'inhiber la croissance de bactéries ou de levures contaminantes. Au delà de 72 heures, il est recommandé de les conserver à - 20°C [6].

Des pré-traitements des échantillons respiratoires destinés à inhiber la flore contaminante peuvent être appliqués afin d'améliorer l'isolement de *Legionella* :

- une acidification suivie d'une neutralisation : le prélèvement est traité volume à volume par une solution tampon de pH 2, 30 minutes à température ambiante, puis neutralisé par un même volume de solution à pH 11 [147] ;
- un traitement par la chaleur (30 minutes à 50°C) dans la mesure où les *Legionella* sont thermo-tolérantes ; la culture de certaines souches de *Legionella* peut être cependant partiellement inhibée [148, 149] ;
- une association des traitements chimique et thermique.

Les fluidifiants utilisés pour les expectorations peuvent inhiber la croissance des légionelles, ce qui impose un lavage du prélèvement après fluidification [6].

1.5.3.2 Milieux de culture

Le premier milieu axénique permettant l'obtention en 4 jours de colonies de *Legionella* présentant un aspect caractéristique en verre fritté à la loupe binoculaire, est le milieu BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*) (composition en annexe 1) contenant du

charbon activé et supplémenté par de l'extrait de levure, de la L-cystéine et du pyrophosphate de fer [150]. Le charbon capture les radicaux libres toxiques générés par l'autoclavage [151].

Ce milieu supplémenté avec 0,1% d'alpha-cétoglutarate (BCYE α) et tamponné à 6,9 (pH optimal pour la croissance de *Legionella*) par du tampon ACES (acide N2-acétamido-amino-éthano-sulfonique) constitue désormais le milieu de choix pour les légionelles.

L'ajout d'antibiotiques et d'antifongiques permet d'inhiber la flore contaminante oro-pharyngée. Trois milieux sélectifs ont été développés à partir du BCYE (Tableau 2) :

- le milieu BMPA [152] ;
- le milieu MWY [149, 153] ;
- le milieu GVPC imposé par la norme NFT90-431 pour la culture des prélèvements environnementaux.

Il est cependant essentiel d'ensemencer systématiquement un milieu BCYE en plus de ces milieux sélectifs. En effet, les antibiotiques contenus dans les milieux sélectifs comme la vancomycine et le céfamandole inhibent partiellement ou totalement la croissance de certaines espèces de légionelles dont *L. longbeachae*, *L. micdadei* et *L. bozemanii* [154].

Les géloses sont examinées 3 jours après ensemencement et leur incubation est poursuivie pendant 10 jours.

Tableau 2. Composition en antibiotiques et antifongiques des milieux BMPA, MWY et GVPC.

	Céfamandole (mg/L)	Polymyxine B (mg/L)	Anisomycine (mg/L)	Vancomycine (mg/L)	Cycloheximide (mg/L)
BMPA	4	80.000	80		
MWY		50.000	80	1	
GVPC		80.000		1	80

1.5.3.3 Identification des colonies

L'identification des bactéries du genre *Legionella* est basée sur :

- la croissance sur milieux BCYE, BMPA, MWY et/ou GVPC et l'absence de croissance sur milieux sans cystéine ;
- l'aspect macroscopique des colonies à la loupe binoculaire qui met en évidence un aspect caractéristique en verre fritté ;

- l'examen des colonies sous lumière ultra-violette à 365 nm, une autofluorescence bleue étant retrouvée pour plus d'une dizaine d'espèces dont *L. anisa*, *L. bozemanii* et *L. dumoffii* [155].

L'identification au niveau de l'espèce et du sérotype est ensuite réalisée par des tests immunologiques qui permettent de distinguer *L. pneumophila* sérotype 1 des autres sérotypes et des autres espèces (trousses Oxoid, BioMérieux et Biorad).

Parmi les *L. pneumophila* sérotype 1, un sous-typage du LPS peut être réalisé selon le panel de Dresden qui définit 9 sous-typeries réunies en deux catégories selon leur réactivité avec l'anticorps monoclonal Mab3/1 [142].

Parmi les *L. pneumophila* sérotypes 2 à 15 (aucun réactif ne permettant l'identification du sérotype 16), l'identification du sérotype peut être réalisée par des techniques « maison » d'immunofluorescence (CNR) ou des agglutinations de particules de latex (réactifs ProLab).

L'identification des *Legionella* non *pneumophila* peut être réalisée par PCR ciblant par exemple l'espace intergénique 23S-5S, l'ARN ribosomal 16S, les gènes *mip* ou *rpoB* puis par séquençage du produit de PCR [156, 157].

1.5.3.4 Performances

La mise en culture des prélèvements respiratoires n'est pas un test diagnostique suffisant. En effet, selon les études, la sensibilité de la culture varie de moins de 10% à plus de 80% [145]. Les meilleurs résultats sont obtenus dans les laboratoires spécialisés où le personnel est expérimenté. Cependant, en France, la culture est maintenant réalisée par de nombreux laboratoires qui sont de plus en plus sensibilisés à cette technique. Parmi les cas de légionellose déclarés en France en 2012, une souche clinique était isolée dans seulement 24% des cas de légionellose (données InVS 2012). Une culture était préférentiellement obtenue pour les cas de légionelloses sévères [99].

Si le diagnostic est posé dans la majorité des cas par la détection d'une antigénurie positive, la culture élargit le diagnostic à toutes les espèces et sérotypes et permet les investigations épidémiologiques.

L'analyse des souches européennes d'origine clinique montre que *L. pneumophila* représente plus de 95% des souches isolées [155]. *L. pneumophila* sérotype 1 prédomine avec 88% des cas (dont 67% de souches Mab3/1 positives), suivie des sérotypes 3 et 6.

Les autres espèces les plus fréquemment isolées, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. anisa*, *L. dumoffii*, *L. feeleii* et *L. longbeachae*, concernent principalement les patients immunodéprimés. Elles sont responsables de cas de légionellose, de fièvres de Pontiac et de formes extra-pulmonaires [158].

L'isolement de *Legionella* à partir du sang est beaucoup plus anecdotique [159-162]. En 1985, Rihs *et al.* montrait que 38% des patients qui correspondaient aux patients présentant une légionellose sévère étaient bactériémiques [163]. Dans cette étude, la lecture automatisée par le système BACTEC (Becton Dickinson) ne permettait pas de détecter une positivité des flacons d'hémoculture. L'isolement des légionelles était obtenu par des subcultures quotidiennes pendant 7 jours à partir des flacons aérobies et anaérobies sur géloses BCYE.

Une méthode alternative serait constituée par l'utilisation préalable à la culture de tubes Isolator[®] qui permettent de concentrer les légionelles et de lyser les cellules infectées [164].

1.5.4 Co-culture amibienne

Au début des années 1980, Robowtham montrait que les *L. pneumophila* appartenant aux sérogroupes 1 à 6 pouvaient se multiplier dans des amibes des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* [32]. En 1983, ils décrivaient pour la première fois une technique de co-culture amibienne avec *Acanthamoeba polyphaga* à partir de prélèvements respiratoires, l'objectif étant d'accroître le nombre de *L. pneumophila* contenues dans le prélèvement [165]. Quinze années plus tard, cette même technique, appliquée à des prélèvements de selles, permettait d'isoler une souche clinique pour un tiers des patients de l'étude, mettant en évidence la capacité de décontamination des prélèvements polymicrobiens par les amibes [166].

Depuis, quelques cas d'isolement de *Legionella* par co-culture amibienne ont été décrits [167, 168]. La Scola *et al.* ont montré que la co-culture amibienne était particulièrement contributive en cas d'antigénurie et de culture négatives [168].

L'intérêt de la co-culture réside également dans l'isolement de LLAPs puisque ces bactéries peuvent se multiplier au sein des amibes mais ne peuvent cultiver sur un milieu axénique [169]. C'est par cette technique que *L. drancourtii*, initialement décrite comme une LLAP car ne cultivant pas sur milieu gélosé à 35°C, a été isolée [18]. Il a été démontré plus tard que *L. drancourtii* n'était pas une LLAP car elle cultivait sur milieu axénique à une température inférieure (32°C).

Cette technique nécessite l'entretien des amibes en milieu riche, le PYG (*Peptone Yeast Glucose*) (composition en annexe 2). Avant co-culture avec le prélèvement, les amibes sont réparties dans des plaques multi-puits en milieu pauvre, le PAS (*Page's amoebic saline*) (composition en annexe 3), afin de favoriser leur infection.

Jusqu'en 2012, aucune étude n'avait été menée de façon prospective afin de déterminer l'apport de la co-culture dans l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements respiratoires. Cette évaluation a fait l'objet de notre travail personnel [170].

1.5.5 Techniques moléculaires

Les techniques moléculaires permettent de détecter potentiellement toutes les légionelles connues. Elles ont été développées sur de nombreux prélèvements : prélèvements respiratoires, sang total, cellules mononucléées de sang périphérique, plasma, urines [171-175]. Les gènes cibles principaux sont :

- les gènes codant l'ARN ribosomal 5S, 16S et l'espace intergénique 23S-5S pour le genre *Legionella* ;
- le gène *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) pour l'espèce *L. pneumophila*.

Depuis 2011, la positivité de la PCR constitue un critère de définition des cas probables de légionellose (Figure 4).

La sensibilité de la PCR varie de 12 à 100% en fonction de la nature du prélèvement (on rapporte une sensibilité inférieure sur les urines) et de l'étude. La majorité des publications rapporte des spécificités proches de 100%.

La technique d'extraction d'ADN peut avoir un impact sur la sensibilité de la technique. En effet, l'étude réalisée par Wilson *et al.* en 2004 montrait que les kits d'extraction donnant les meilleurs résultats sur les expectorations et les lavages broncho-alvéolaires étaient les kits automatisés MagNA Pure® (Roche) et NucliSens® (BioMérieux). Parmi les kits d'extraction manuelle, celui qui donnait le meilleur résultat était le kit HighPure PCR Template Preparation Kit® (Roche) [176].

1.5.5.1 Prélèvements respiratoires

Lorsque la PCR est réalisée sur des prélèvements respiratoires, elle montre une sensibilité supérieure à la culture et une excellente spécificité [177-179]. Cette sensibilité varie selon les études mais reste supérieure à 80% [172, 180]. Cependant, les performances de la PCR sur prélèvements respiratoires restent inférieures à celles des tests détectant l'antigène urinaire [179]. Maurin *et al.* ont montré qu'une PCR présentant un signal fortement positif à l'admission était corrélée à la sévérité de la légionellose, à l'admission en réanimation et à la durée d'hospitalisation. Ces données suggèrent que la PCR quantitative en temps réel pourrait constituer un marqueur diagnostique et pronostique [181]. Son apport dans la prise en charge des légionelloses reste à évaluer. Enfin, Korosec *et al.* ont montré chez trois patients que la PCR se négativait dans les 4 à 6 jours suivant l'initiation de l'antibiothérapie, d'où l'importance de réaliser des prélèvements pulmonaires précocement après l'apparition des symptômes [182].

1.5.5.2 Urine et sérum

L'application de la PCR sur d'autres prélèvements comme le sang ou les urines est séduisante car elle permettrait de contourner le problème des patients n'expectorant pas et éviterait la réalisation de prélèvements invasifs. Cependant, ses performances restent bien inférieures à celles observées à partir de prélèvements pulmonaires.

La détection de l'ADN de *Legionella* dans le sérum a été décrite pour la première fois par Lindsay *et al.* en 1994 [183]. Les données de la littérature rapportent une sensibilité de la PCR sérique comprise entre 29 et 80,5% [175, 179, 180, 184, 185]. Ces performances sembleraient liées à la faible fréquence des bactériémies au cours des légionelloses et, lorsqu'une bactériémie existe, à la faible quantité d'ADN retrouvée dans le sang. La sensibilité de la PCR sur sérum est corrélée à la précocité du prélèvement [175, 180]. Le signal se négative généralement dans les deux premières semaines suivant l'apparition des symptômes [175, 185, 186]. Cependant, Lindsay *et al.* ont décrit une décroissance beaucoup plus lente, avec un pic du signal 6 à 7 jours après le début des symptômes [180].

La mise en œuvre des PCR sur culot leucocytaire plutôt que sur plasma ou sérum permettrait d'améliorer ces performances [185, 187].

Enfin, l'apport de la PCR sur les urines semble très limité en raison de son manque de sensibilité, celle-ci variant entre 7 et 72% selon les études [174, 175, 179, 185, 188]. En comparaison avec les tests détectant les antigènes urinaires, Koidé *et al.* ont rapporté une sensibilité quatre fois plus faible pour la PCR [179]. Le délai de négativation du signal dans les urines semble supérieur à celui observé sur sérum, les PCR positives ayant été observées jusqu'à plus de 36 et 56 jours après le début des symptômes chez certains patients [175, 185].

1.5.6 Sérologie

Les anticorps apparaissent généralement 2 semaines après le début de l'infection, le pic étant atteint après 4 à 5 semaines. Des séroconversions précoces ou apparaissant après 2 mois ou même davantage ont été rapportées. La recherche spécifique d'IgM n'est pas recommandée en raison d'une absence chez certains sujets [189]. La disparition des anticorps varie de 2 à 18 mois [6].

Différentes techniques de sérologie peuvent être proposées :

- le CNR utilise des antigènes préparés à partir de sacs vitellins d'embryons de poulet et inactivés par du formol, selon la méthode de Taylor et Harrison [190] ; des antigènes monovalents et polyvalents de l'ensemble des sérogroupes et des espèces

de *Legionella* sont ainsi préparés ; la lecture est réalisée par immunofluorescence indirecte ;

- les réactifs commercialisés utilisent des antigènes préparés sur milieu gélosé, pour la plupart monovalents pour *L. pneumophila* séro groupe 1 et polyvalents pour les autres *Legionella* ; leur principe repose sur l'immunofluorescence indirecte ou l'ELISA [191, 192].

La sensibilité de la sérologie pour le diagnostic de légionellose varie de 41 à 75% selon les études. Ces variations peuvent être dues aux différents modes de préparation antigénique, aux souches utilisées pour cette préparation, à la valence (mono- ou polyvalence) des antigènes utilisés, aux classes d'immunoglobulines détectées, aux population étudiées et aux réactions croisées [6].

De nombreuses réactions croisées ont été décrites avec les mycobactéries, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Coxiella*, *Pseudomonas*... [193-196]. Des réactions croisées sont également rencontrées entre les différents sérogroupes et les différentes espèces de *Legionella*, rendant parfois impossible un diagnostic précis. Une réaction croisée très fréquente a été observée entre le séro groupe 1 et le séro groupe 6 de *L. pneumophila*.

Dans tous les cas, les résultats d'un sérodiagnostic de légionellose doivent être impérativement interprétés en présence d'une pneumopathie et ne permettent qu'un diagnostic rétrospectif. L'intérêt de la sérologie demeure donc limité.

1.5.7 Performances et évolution des méthodes diagnostiques

Les performances des différentes techniques utilisées pour le diagnostic des légionelloses sont décrites dans le tableau 3 [145, 197].

La détection des antigènes urinaires demeure la méthode la plus répandue en France (Figure 5).

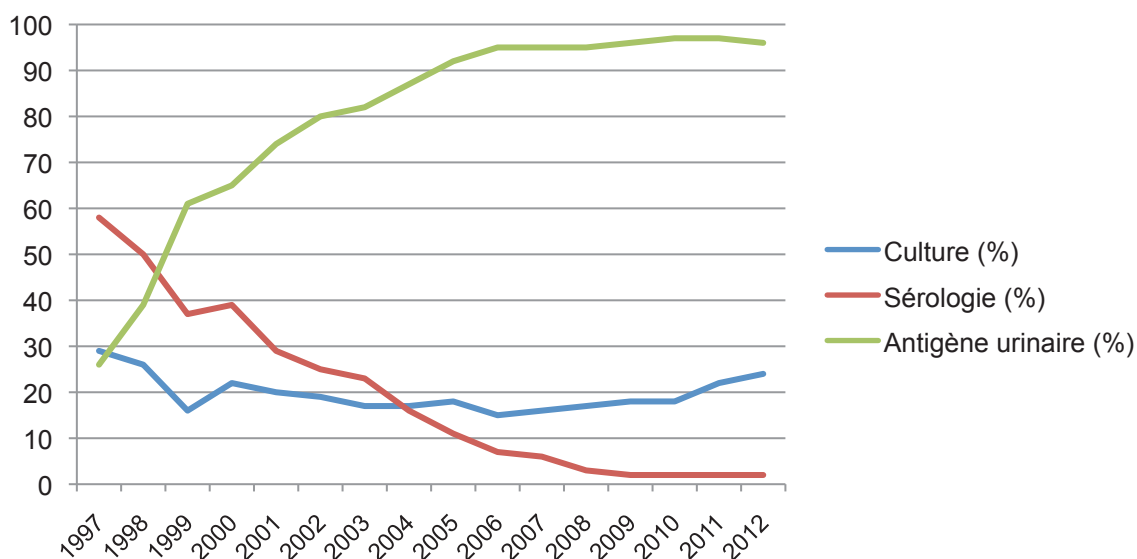


Figure 5. Répartition des méthodes diagnostiques des cas de légionellose en France, 1997-2012 (données InVS).

Tableau 3. Performances des méthodes diagnostiques de la légionellose [6].

Méthode	Délai de résultat	Echantillon	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Avantages	Inconvénients
Antigène soluble urinaire	1 h à 4 h	Urine	56-80	> 99	<ul style="list-style-type: none"> Diagnostic rapide et précoce Simple et rapide Possible sous antibiotiques 	<ul style="list-style-type: none"> Ne permet la détection fiable que de <i>L. pneumophila</i> sérotype 1
Culture	3 à 10 jours	Respiratoire et divers	< 10-80	100	<ul style="list-style-type: none"> Diagnostic de certitude Détection de toutes les espèces et sérogroupes Indispensable pour les enquêtes épidémiologiques 	<ul style="list-style-type: none"> Milieux spécifiques Demande spécifique Lentur Peu sensible sous traitement antibiotique
Co-culture	3 à 10 jours	Respiratoire et divers	< 10	100	<ul style="list-style-type: none"> Décontamination des prélèvements 	<ul style="list-style-type: none"> Laboratoires spécialisés
Sérologie	3 à 10 semaines	Sérum	60-80	> 95	<ul style="list-style-type: none"> Intérêt épidémiologique Détection de toutes les espèces et sérogroupes 	<ul style="list-style-type: none"> Peu d'intérêt en aigu Interprétation délicate Diagnostics rétrospectifs
PCR	24 h	Respiratoire	80-100	> 99	<ul style="list-style-type: none"> Détection de toutes les espèces et sérogroupes Rapidité 	<ul style="list-style-type: none"> Laboratoires spécialisés
		Sang	30-50			
		Urine	46-86			

2 Legionella et antibiotiques

Un antibiotique pouvant être recommandé pour le traitement de la légionellose doit satisfaire à plusieurs pré-requis :

- être actif *in vitro* sur *Legionella* ;
- présenter une bonne diffusion au niveau des différents tissus respiratoires ;
- présenter une bonne concentration et une bonne activité intra-cellulaire ;
- avoir démontré une bonne efficacité sur modèle expérimental animal ;
- présenter une activité clinique documentée, en particulier dans les formes graves.

De ce fait, l'antibiothérapie des légionelloses fait appel à des antibiotiques appartenant à 4 familles thérapeutiques, les macrolides, les fluoroquinolones, les rifamycines (rifampicine) et les tétracyclines (doxycycline).

2.1 Stratégie thérapeutique

2.1.1 Recommandations de l'Afssaps en France

Le choix thérapeutique dépend de l'efficacité clinique démontrée par les différents antibiotiques, de la gravité de la légionellose, du terrain sous-jacent (troubles hépatiques, digestifs, interactions médicamenteuses) et de la sécurité d'emploi de l'antibiotique. Ainsi, les macrolides, dont l'efficacité est incontestée dans cette indication, sont recommandés en monothérapie pour le traitement des légionelloses d'intensité légère à modérée (formes ambulatoires, formes hospitalisées dans un service d'urgences ou de médecine) et en association pour les formes graves et/ou chez les sujets immunodéprimés. Les fluoroquinolones sont réservées aux formes graves de légionellose et au sujet immunodéprimé, en monothérapie ou en association (Tableau 4). Ce ciblage d'utilisation est conforme à la politique générale de restriction de l'utilisation des fluoroquinolones du fait des risques individuels et collectifs liés à l'émergence d'antibio-résistance (*Neisseria gonorrhoeae*, *Enterobacteriaceae* notamment *Escherichia coli* résistant aux quinolones).

Les voies d'administration injectable (intraveineuse) ou orale peuvent être utilisées, le choix dépendant de la gravité de la légionellose. L'existence de troubles digestifs, même mineurs, invite à recourir à la voie injectable. Les doses doivent être adaptées au terrain sous-jacent (insuffisance hépatique ou rénale) (Tableau 5).

Enfin, la durée du traitement est de 8 à 14 jours pour les formes non graves (5 jours pour l'azithromycine), allongée à 21 jours dans les formes graves et/ou chez l'immunodéprimé (10 jours pour l'azithromycine).

Tableau 4. Stratégie du choix antibiotique [198].

Gravité de la légionellose / terrain sous-jacent	Choix antibiotique
Légionellose non grave : patient ambulatoire ou hospitalisé dans un service d'urgences ou en médecine	Monothérapie par macrolide : azithromycine ou clarithromycine ou roxithromycine ou josamycine ou spiramycine ou érythromycine (par ordre de préférence selon le rapport bénéfice-sécurité)
	Soit monothérapie par fluoroquinolone : lévofloxacine ou ofloxacine ou ciprofloxacine (par ordre de préférence selon le rapport bénéfice-sécurité)
Légionellose grave : patient hospitalisé dans un service de soins intensifs ou de réanimation et/ou patient immunodéprimé	Soit association de 2 antibiotiques au sein des 3 familles d'antibiotiques suivantes (les associations contenant de la rifampicine ne sont pas à privilégier) : <ul style="list-style-type: none">- macrolide disponible par voie IV : spiramycine ou érythromycine (par ordre de préférence selon le rapport bénéfice-sécurité)- fluoroquinolone : lévofloxacine ou ofloxacine ou ciprofloxacine (par ordre de préférence selon le rapport bénéfice-sécurité)- rifampicine

Les **macrolides** constituent la classe thérapeutique historique des légionelloses. L'utilisation de l'érythromycine puis des autres macrolides est basée sur l'expérience clinique. Cet antibiotique est disponible sous forme orale et intraveineuse, la voie injectable nécessitant de grands volumes de perfusion. Le profil de sécurité d'emploi de l'érythromycine est à prendre en considération, notamment l'intolérance digestive, les interactions médicamenteuses nombreuses, les troubles du rythme cardiaque et les contraintes liées à l'administration injectable ainsi que la veinotoxicité.

La clarithromycine dispose d'une présentation pharmaceutique pour l'administration intraveineuse pour laquelle l'AMM de cet antibiotique en France ne comporte pas d'indication en lien avec la légionellose en raison de données insuffisantes pour la clarithromycine injectable dans le traitement de cette infection.

L'azithromycine, la roxithromycine et la josamycine ne disposent que de formes pharmaceutiques destinées à la voie orale.

La spiramycine présente moins d'interactions médicamenteuses que les autres macrolides.

Tableau 5. Schéma d'administration des antibiotiques recommandés en France [198].

Familles d'antibiotiques	Posologies quotidiennes (établies pour un adulte aux fonctions réale et hépatique normales)	
Macrolides	Azithromycine	Voie orale : 500 mg x 1/jour
	Clarithromycine	Voie orale : 500 mg x 2/jour
	Roxithromycine	Voie orale : 150 mg x 2/jour
	Josamycine	Voie orale : 1 g x 2/jour
	Spiramycine	Voie orale : 9 M UI/jour en 2 ou 3 prises Voie injectable (IV) : 3 M UI x 3/jour
	Erythromycine	Voie orale : 1 g x 3/jour Voie injectable (IV) : 1 g x 3 à 4/jour
Fluoroquinolones	Lévofoxacine	Voies injectable (IV) ou orale : 400 mg x 1 à 2/jour
	Ofloxacine	Voies injectable (IV) ou orale : 400 à 800 mg/jour en 2 à 3 prises/jour
	Ciprofloxacine	Voie injectable (IV) : 400 mg x 2 à 3/jour Voie orale : 500 à 750 mg x 2/jour
Rifampicine	Rifampicine	Voies injectable (IV) ou orale : 20 à 30 mg/kg/jour en 2 perfusions/prise

Les **fluoroquinolones** doivent être utilisées avec prudence notamment en institution en raison :

- du risque d'émergence de souches résistantes ;
- du risque accru de tendinopathie, notamment chez les sujets âgés ou chez les sujets sous corticothérapie par voie générale ;
- des interactions avec les macrolides avec notamment un effet potentialisateur sur l'allongement de l'intervalle QT.

La moxifloxacine administrée par voie orale et intraveineuse, du fait de son profil de risques, étant réservée au traitement des pneumonies communautaires lorsqu'aucun autre antibiotique ne peut être utilisé (400 mg x 1/jour IV ou *per os*), et ne pouvant pas être associée aux macrolides administrés par voie IV, a été exclue de la stratégie thérapeutique privilégiée en cas de légionellose documentée.

Depuis septembre 2012, cette restriction d'indication s'applique également pour la lévofoxacine, qui n'est indiquée que lorsque les antibiotiques recommandés dans les traitements initiaux de ces infections sont jugés inappropriés.

2.1.2 Recommandations des autres sociétés savantes

Dans d'autres pays d'Europe et aux USA, les recommandations pour la prise en charge des légionelloses sont intégrées aux recommandations pour la prise en charge des pneumonies communautaires. Les recommandations pour l'Europe, la Grande-Bretagne, et les USA sont regroupées dans le tableau 6. Les associations d'antibiotiques sont peu recommandées à l'étranger. La doxycycline est recommandée en deuxième intention aux USA.

Par ailleurs, notons que les AMM et les formes galéniques des antibiotiques diffèrent selon le pays. Par exemple :

- la clarithromycine est administrable par voie intraveineuse (IV) en Grande-Bretagne [199], alors que seule la forme orale est commercialisée en France (sans d'AMM dans cette indication) et aux USA [72] ;
- l'azithromycine a une AMM pour le traitement des légionelloses en Espagne, en Grande-Bretagne, aux USA, mais pas en France ; la forme IV, disponible aux USA et au Canada, n'est pas commercialisée en Espagne [200] ;
- la ciprofloxacine n'est disponible sous forme IV que depuis 2000 au Japon [201].

Tableau 6. Recommandations pour le traitement de la légionellose à l'étranger.

	Europe <i>European Respiratory Society</i>	Grande-Bretagne <i>British Thoracic Society</i>	USA <i>Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society</i>
Référence bibliographique	Woodhead <i>et al.</i> , 2011 [202]	Lim <i>et al.</i> , 2009 [199]	Mandell <i>et al.</i> , 2007 [203]
Antibiothérapie de 1^{ère} ligne	Fluoroquinolone respiratoire (lévofloxacine ou moxifloxacine) ou Macrolide (azithromycine de préférence)	Fluoroquinolone : ciprofloxacine, ofloxacine ou lévofloxacine, IV ou <i>per os</i> (moxifloxacine en 2 ^{ème} intention)	Fluoroquinolone (sans précision) ou Azithromycine
Alternative	± Rifampicine	Clarithromycine IV ou <i>per os</i> ou Azithromycine	Doxycycline

2.1.3 Des recommandations aux pratiques quotidiennes

En France, l'étude de Chidiac *et al.* portant sur une cohorte de 540 patients a montré que [99]:

- seulement 14,4% des patients avaient bénéficié d'une antibiothérapie probabiliste adaptée avant admission (la plupart recevant des β -lactamines) ;
- 70,8% des patients avaient reçu une antibiothérapie adaptée à l'admission ;
- 100% des patients avaient reçu une antibiothérapie adaptée après confirmation du diagnostic.

Les données non publiées de cette étude montraient que :

- les antibiotiques les plus prescrits étaient les fluoroquinolones (67% des cas) ;
- une monothérapie adaptée était prescrite dans 41% des cas, une bithérapie dans 52% et une trithérapie dans 6% des cas ;
- les bithérapies étaient représentées par une association macrolide – fluoroquinolone dans 70% des cas, fluoroquinolone – rifampicine dans plus de 28% des cas et macrolide – rifampicine dans moins de 2% des cas ;
- les β -lactamines, inactives sur *Legionella*, restaient prescrites dans plus de 20% des cas ;
- l'utilisation de deux antibiotiques recommandés après confirmation du diagnostic de légionellose était associée à un score de gravité (PSI) plus élevé, une durée de séjour prolongée, un taux supérieur d'hospitalisation en réanimation et une mortalité plus élevée.

2.2 Etude de la sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques

2.2.1 Indication de l'antibiogramme

Legionella est caractérisée par une sensibilité constante *in vitro* aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine. A ce jour, aucune souche clinique résistante aux antibiotiques n'a été isolée [1, 204]. Edelstein *et al.* ont montré dans une étude *in vivo* que l'administration de rifampicine en monothérapie à des cobayes ne permettait pas de sélectionner des mutants résistants [205]. Par ailleurs, l'absence de porteur sain et de transmission interhumaine ne favorisait pas l'émergence de mutants résistants chez *Legionella*. Pour ces raisons, la réalisation systématique d'un antibiogramme n'est pas recommandée.

Néanmoins, des échecs thérapeutiques, définis à la fois par une absence d'amélioration clinique et/ou radiologique et par la persistance de *Legionella pneumophila* dans les prélèvements malgré une antibiothérapie adaptée sont régulièrement rapportés chez des patients immunodéprimés mais également chez l'immunocompétent [206-208].

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'intervenir dans ces échecs thérapeutiques. Il peut s'agir de facteurs liés à l'hôte tels que son statut immunitaire, sa susceptibilité à l'infection (polymorphisme génétique des TLR), la présence de co-morbidités et de complications pulmonaires et extra-pulmonaires. Par ailleurs, le degré de virulence de la souche pathogène intervient probablement également.

L'une des hypothèses est l'existence de *Legionella* de sensibilité diminuée aux antibiotiques administrés. Plusieurs travaux ont montré la facilité avec laquelle des mutants résistants aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine pouvaient être sélectionnés *in vitro* [2, 4, 5, 209]. Les mécanismes moléculaires induisant cette résistance impliquent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV pour les fluoroquinolones et l'ARN polymérase pour la rifampicine [4, 5]. Les mécanismes impliqués dans la résistance aux macrolides n'ont pas été décrits. Ainsi, la présence d'antibiotiques présents à de faibles concentrations dans l'environnement, comme les fluoroquinolones utilisées en pisciculture pourrait favoriser l'émergence de résistances en amont de l'infection [210]. De plus, à l'échelle individuelle, *Legionella* pourrait acquérir une résistance au cours de l'antibiothérapie.

La réalisation d'un antibiogramme peut donc être préconisée dans un contexte d'échec thérapeutique.

2.2.2 Méthodes extracellulaires

L'activité des antibiotiques sur *Legionella* peut être étudiée par des méthodes « conventionnelles » extracellulaires qui permettent de déterminer la concentration minimale d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne (CMI). Ces méthodes conventionnelles peuvent être mises en œuvre par tout laboratoire.

Il n'existe actuellement aucune recommandation pour la réalisation d'antibiogrammes de *Legionella*. Cette problématique fait actuellement l'objet de réflexions à l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) dont le rôle est d'harmoniser les techniques et l'interprétation des antibiogrammes en Europe.

En l'absence de recommandation, la réalisation d'un antibiogramme pour *Legionella* impose de définir différents paramètres :

- le type de technique ;
- le milieu de culture ;

- l'inoculum bactérien ;
- la durée, la température et l'atmosphère d'incubation.

2.2.2.1 Techniques

Différentes techniques extracellulaires peuvent être mises en œuvre (Figure 6) :

- diffusion en milieu solide utilisant des disques imprégnés d'antibiotiques où la sensibilité est corrélée au diamètre d'inhibition autour des disques ;
- diffusion en milieu solide utilisant des bandelettes imprégnées d'antibiotique (Etest®) où la CMI correspond à la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle les colonies bactériennes ne peuvent confluer autour de la bandelette ;
- dilution de l'antibiotique de deux en deux en milieu solide, où la CMI correspond à la plus petite concentration d'antibiotique contenue dans la gélose inhibant la croissance bactérienne ;
- dilution de l'antibiotique de deux en deux en milieu liquide ou « microdilution », où la CMI correspond à la plus petite concentration d'antibiotique présente dans le puits pour lequel aucune croissance bactérienne n'est visible à l'œil nu.

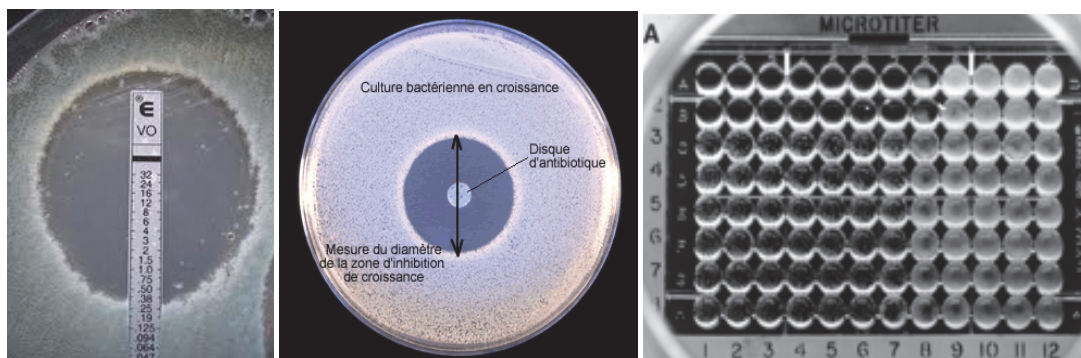


Figure 6. Méthodes extracellulaires par diffusion (Etest® et disque) et par microdilution pour des genres bactériens autres que *Legionella*.

Pour *Legionella*, les techniques Etest®, les méthodes par dilution en milieu gélosé et par microdilution sont les plus utilisées. La méthode par microdilution impose la fabrication d'un milieu de culture liquide « maison », le BYE (*Buffered Yeast Extract*), aucun milieu de culture liquide n'étant commercialisé (la composition du milieu BYE est reportée en annexe 4).

La méthode des disques est moins souvent décrite car elle nécessite une corrélation préalable entre diamètre d'inhibition et CMI déterminée par une autre technique. Dowling *et al.* en 1984 puis Bruin *et al.* en 2013 ont montré une bonne corrélation entre les CMI déterminées par bandelette Etest® sur milieu BCYE et les diamètres d'inhibition sur BCYE

pour les macrolides et les fluoroquinolones [211, 212]. Néanmoins, aucune corrélation n'a été obtenue pour la rifampicine dans ces deux études.

2.2.2.2 Milieux de culture

Le choix du milieu est primordial car celui-ci doit permettre une croissance suffisante des légionelles sans inhiber l'action des antibiotiques. La croissance de *Legionella* est optimale à un pH de 6,9 [213]. Elle est inhibée par les dérivés réactifs de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène, radicaux superoxydes) générés pendant l'autoclavage [151]. Le charbon contenu dans le milieu BCYE réduit ces substances toxiques [151, 213-215]. En contrepartie, il inhibe de nombreux antibiotiques. Ruckdeschel *et al.* ont montré que les quinolones, l'érythromycine et la rifampicine se liaient rapidement au charbon et que leur fraction libre dans le milieu représentait alors moins de 8% de la concentration totale d'antibiotique. En fonction de la fraction libre des antibiotiques, des CMI corrigées peuvent être calculées à partir des CMI obtenues sur BCYE. Les CMI corrigées deviennent alors comparables aux CMI obtenues sur milieux ne contenant pas de charbon [216].

Les milieux solides sans charbon sont le BSYE (*Buffered Starch Yeast Extract*) et le BYE (*Buffered Yeast Extract*). Les CMI déterminées sur BYE ou BSYE sont bien inférieures, jusqu'à cinq dilutions plus basses, que les CMI déterminées sur BCYE (soit divisées par 32) [216-220]. Cependant, une croissance insuffisante a été décrite sur ces milieux exposant le biologiste au risque de rendre des CMI faussement basses et conduisant Pendland *et al.* à recommander l'utilisation du milieu BCYE pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques [217, 218]. Bruin *et al.* ont proposé de réaliser les antibiogrammes par bandelette Etest® sur milieu BCYE car cette technique est simple, rapide à lire et applicable au laboratoire de routine.

Cependant, l'intérêt des antibiogrammes réalisés en présence de charbon se limite à la détection de légionelles résistantes aux antibiotiques. En effet, les valeurs de CMI sont majorées par la présence de charbon dans le milieu et ne peuvent être directement corrélées aux concentrations sériques des antibiotiques [221, 222].

2.2.2.3 Inoculum bactérien

La valeur de l'inoculum peut également influencer les résultats de CMI. Selon les études, l'inoculum bactérien utilisé varie entre 10^3 et 10^7 UFC/mL. Sa multiplication par un facteur 100 s'accompagne d'une élévation de la CMI de une à deux dilutions (soit une CMI multipliée par 2 à 4) [216-220, 223]. En milieu liquide, l'inoculum bactérien est généralement compris entre $5 \cdot 10^4$ et $5 \cdot 10^5$ UFC/mL [224, 225].

2.2.2.4 Modalités d'incubation

La lecture des CMI est effectuée après une durée d'incubation minimale de 48 heures. Lorsque l'inoculum bactérien est faible (10^4 UFC/mL), un allongement du temps d'incubation à 96 heures multiplie la CMI par deux ce qui n'est pas observé pour un inoculum à 10^5 UFC/mL [218]. La durée d'incubation a peu ou pas d'impact sur les CMI de *Legionella* [218, 220, 223].

Enfin, la température d'incubation (généralement 35°C) doit être adaptée aux exigences de l'espèce de *Legionella*, par exemple 32°C pour *L. drancourtii*. Selon les auteurs, l'incubation est réalisée à l'air ou sous CO₂ à 2,5%. L'influence du CO₂ sur les CMI a été peu étudiée.

2.2.2.5 Activité extracellulaire des antibiotiques

Parmi les trois classes d'antibiotiques actifs sur *Legionella*, la rifampicine possède les CMI les plus faibles, de l'ordre du µg/L. La CMB est la concentration minimale bactéricide d'un antibiotique, c'est-à-dire la concentration qui inhibe la croissance de plus de 99,9% des bactéries. Selon les auteurs, le ratio CMB/CMI de la rifampicine est compris entre 1 et 16 [226-229].

Parmi les macrolides, l'azithromycine est la molécule la plus active. La clarithromycine, la roxithromycine et la josamycine sont plus efficaces *in vitro* vis-à-vis de *Legionella* que l'érythromycine. La spiramycine présente une moindre activité mais sans différence d'efficacité clinique observée lors de traitements de légionellose. Seule la clarithromycine montre un effet post-antibiotique [230, 231]. Enfin, le ratio CMB/CMI des macrolides est compris entre 2 et 8 [226-229].

Toutes les fluoroquinolones possèdent une excellente activité extracellulaire sur *L. pneumophila* avec de faibles CMI. Le ratio CMB/CMI des fluoroquinolones est compris entre 1 et 8 [226-229]. La lévofloxacine présente un effet post-antibiotique marqué, sa durée variant en fonction de l'inoculum, de la souche de légionelle et de la concentration d'antibiotique [230].

Les CMI de la rifampicine, des principaux macrolides et des fluoroquinolones sont reportées dans le tableau 7.

Tableau 7. Concentrations minimales inhibitrices extracellulaires (mg/L) de la rifampicine, des macrolides et des fluoroquinolones pour *Legionella* spp.

Référence bibliographique	Méthode	Rifampicine	Macrolides					Fluoroquinolones		
			Erythro.	Clarithro.	Azithro.	Roxithro.	Dirithro.	Lévoflox.	Oflox.	Ciprofloxo.
Bruin <i>et al.</i> [221]	Estest BCYE	0,008 – 1	0,032 – 2	0,064 – 1	0,032 – 8		0,064 – 1		0,25 – 2	0,25 – 1
Roch <i>et al.</i> [229]	Microdilution	≤ 0,001	1				0,03		0,03 – 0,06	0,06
Baltch <i>et al.</i> [225]	Microdilution		0,25				0,016			0,03
Jonas <i>et al.</i> [224]	Microdilution						0,015 – 0,03		0,015 – 0,03	0,015 – 0,03
Gomez-Lus <i>et al.</i> [228]	Dilution en gélose BYE	≤ 0,004 – 0,008	0,06 – 1				0,008 – 0,03	0,016 – 0,25	0,016 – 0,25	0,004 – 0,03
Takemura <i>et al.</i> [232]	Microdilution	0,00025	0,25 – 0,5	0,032	0,125				0,016 – 0,032	
Kunishima <i>et al.</i> [233]	Microdilution		0,25	0,032					0,016	
Garcia <i>et al.</i> [233]	Dilution en gélose BCYE	Microdilution	0,03 – 1	0,0004 – 0,03			0,007 – 0,03	0,007 – 0,06	0,0018 – 0,03	
			0,03 – 0,5	0,03 – 0,12			0,06 – 0,25	0,25 – 1	0,12 – 1	
Higa <i>et al.</i> [234]	Microdilution	0,002	0,125	0,031	0,063	0,063	0,063		0031	
Ruckdeschel <i>et al.</i> [216]	Dilution en gélose BCYE	0,002 – 0,005	0,1 – 0,27						0,004 – 0,02	0,004 – 0,018

Référence bibliographique	Méthode	Rifampicine	Macrolides					Fluoroquinolones		
			Erythro.	Clarithro.	Azithro.	Roxithro.	Dirithro.	Lévoflox.	Oflox.	Ciprofloxx.
Schulin <i>et al.</i> [218]	Dilution en gélose BCYE	0,002 – 0,008	0,12 – 0,25	≤ 0,004		0,03 – 0,12		0,015 – 0,03		
Stout <i>et al.</i> [235]	Microdilution	0,25						0,015	0,015	0,03
Stout <i>et al.</i> [236]	Microdilution	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1			
Pendland <i>et al.</i> [217]	Dilution en gélose BCYE	0,25 – 1	0,25 – 0,5	0,25 – 2					1 – 2	
		Dilution en gélose BSYE	0,008 – 0,12	0,002 – 0,015	0,008 – 0,015				0,002 – 0,03	
Martin <i>et al.</i> [231]	Dilution en gélose BCYE		0,5							
Schrock <i>et al.</i> [237]	Eltest BCYE	0,094 – 0,19	0,008 – 0,023	0,047 – 0,19		0,064 – 0,094	0,094 – 0,19	0,25 – 0,38		
Segreti <i>et al.</i> [238]	Microdilution	0,06 – 0,25	≤ 0,015 – 0,06	0,03 – 0,12						
Martin <i>et al.</i> [239]	Dilution en gélose BCYE	0,25 – 1	0,125 – 0,5	0,125 – 2		0,5 – 1		1 – 2		
Baltch <i>et al.</i> [227]	Dilution agar BCYE	≤ 0,004	1			0,125	0,25			

Référence bibliographique	Méthode	Rifampicine	Macrolides					Fluoroquinolones				
			Erythro.	Clarithro.	Azithro.	Roxithro.	Dirithro.	Lévoflox.	Oflox.	Ciprofloxx.	Moxiflox.	
Rhomberg <i>et al.</i> [219]	Etest BCYE	8										
Collins <i>et al.</i> [240]	Dilution en gélose BSYE	≤ 0,015	0,25	≤ 0,015								0,03
Johnson <i>et al.</i> [241]	Dilution en gélose BSYE	≤ 0,002 – 0,03	≤ 0,015 – 1	0,015 – 0,5	0,03 – 4	0,03 – 0,5	0,25 – 4					0,015 – 0,06
Edelstein <i>et al.</i> [204]	Dilution en gélose BCYE		0,5 - 1		0,25 – 1,5							≤ 0,03 – 0,5
	Microdilution		0,125		0,06 – 0,125							0,06
Jones <i>et al.</i> [242]	Dilution en gélose BSYE			0,05 – 0,25								
Barker <i>et al.</i> [226]	Microdilution	0,0005	0,125									0,015
Hardy <i>et al.</i> [243]	Dilution en gélose BCYE		0,5 – 2	0,12 – 0,25	0,12 – 0,2	0,12 – 0,5	1 – 16					
Moffe <i>et al.</i> [244]	Dilution en gélose BYE	0,004	0,125									0,032
Edelstein <i>et al.</i> [245]	Dilution en gélose CYE	0,005 – 0,125		≤ 0,06 – 0,5								

2.2.2.6 Limites des méthodes extracellulaires

L'étude de la sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques par les méthodes extracellulaires est techniquement facile.

Bien que la plupart des espèces de *Legionella* à l'exception de *L. micdadei*, *L. feelei* et *L. maceachernii* sécrètent une β -lactamase [246] et que leur inefficacité soit démontrée *in vivo*, les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes) présentent une excellente activité extracellulaire sur *Legionella* avec des CMI de l'ordre du mg/L. Cependant, pour des concentrations supérieures aux CMI, aucune activité sur les légionelles présentes à l'intérieur des cellules infectées n'est observée, ce qui démontre l'intérêt des méthodes intracellulaires [220, 234, 240, 247, 248].

2.2.3 Méthodes intracellulaires

2.2.3.1 Définition de la CMIE

Les méthodes intracellulaires consistent à infecter des cellules par *L. pneumophila* en présence d'une gamme croissante d'antibiotiques, puis à quantifier la croissance bactérienne intracellulaire. Ces méthodes permettent de déterminer la CMIE d'un antibiotique définie par Vildé *et al.* comme la concentration minimale extracellulaire d'antibiotique inhibant la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* [249]. Cette méthode prend en compte la diffusion de l'antibiotique dans la cellule infectée et son activité intracellulaire.

2.2.3.2 Choix de la méthode

Il n'existe aucune méthode standardisée permettant d'étudier l'activité intracellulaire des antibiotiques sur *L. pneumophila*. Plusieurs paramètres varient selon les études :

- la nature des cellules infectées : cellules recueillies *in vivo* ou lignée cellulaire, cellules animales ou humaines ;
- le ratio nombre de bactéries / nombre de cellules infectées ou MOI (*multiplicity of infection*) ;
- le temps de contact bactéries / cellules, nécessaire à l'adhésion et à la phagocytose des légionelles par la cellule ;
- la durée de contact des cellules infectées avec l'antibiotique ;
- le mode de mesure de la croissance bactérienne intracellulaire.

L'activité intracellulaire des antibiotiques sur *Legionella* a été étudiée sur différents types cellulaires. Des macrophages alvéolaires de cobaye ont initialement été utilisés [250]. Des monocytes isolés à partir de sang humain prélevé sur tube hépariné peuvent être également infectés [225]. Cela impose de séparer les cellules mononucléées des polynucléaires, puis de les infecter rapidement, la demi-vie des monocytes étant de huit heures. De plus, l'utilisation de monocytes de donneurs différents constitue un facteur de variabilité des résultats.

L'emploi de lignées cellulaires tumorales permet de standardiser les méthodes intracellulaires. Ces lignées peuvent être animales, comme la lignée de macrophages murins J774.1 mais l'utilisation de lignées humaines semble plus satisfaisante pour une transposition des résultats à l'Homme [234]. De nombreuses lignées cellulaires humaines peuvent être utilisées pour étudier l'activité intracellulaire des antibiotiques sur *Legionella*, comme les lignées :

- U-937 (lymphome histiocytaire) [251] ;
- HL-60 (leucémie promyélocytaire) [235, 236] ;
- THP-1 (leucémie aiguë monocytaire) [229, 232, 233] ;
- Mono Mac 6 (monocytes) [224] ;
- A-549 (cellules épithéliales alvéolaires) [233] ;
- MRC-5 (fibroblastes pulmonaires fœtaux).

Les cellules U-937, HL-60 et THP-1 doivent être différenciées en macrophages adhérents par du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) un à deux jours avant l'infection par *Legionella*.

La MOI varie de 1 à 100 selon des études [224, 229]. Après infection, une centrifugation peut être réalisée pour favoriser l'adhésion des légionelles aux cellules [232, 233]. Une incubation variant de 1 à 6 h selon les auteurs permet l'adhésion et la phagocytose des bactéries par les cellules [229, 235]. En fonction de la MOI initiale, 1 à 10% des légionelles sont phagocytées. Un lavage éliminant les bactéries n'ayant pas adhéré aux cellules est réalisé, puis les cellules sont incubées en présence d'antibiotiques pour une durée comprise entre 24 et 72 heures selon les auteurs. La croissance bactérienne est le reflet de l'activité intracellulaire de l'antibiotique.

La quantification bactérienne est généralement effectuée par une méthode conventionnelle qui consiste à dénombrer les UFC/mL par des dilutions en cascade de 10 en 10. Cette méthode est fastidieuse et les dénombrements des différentes dilutions sont parfois difficilement corrélables. La quantification bactérienne par PCR en temps réel est une alternative moins laborieuse, plus fiable et plus adaptée aux grandes séries [229]. Des

méthodes colorimétriques basées sur l'effet cytopathogène de l'infection par *L. pneumophila* ont été développées : les cellules viables (non lysées par la bactérie) clivent un substrat et la D.O. du produit est inversement proportionnelle à la réplication bactérienne intracellulaire [234]. Ces méthodes apprécient la croissance intracellulaire de façon indirecte.

Enfin, la définition même de la CMIE varie selon les auteurs. Dans la méthode décrite initialement par Vildé *et al.*, la CMIE est la concentration minimale extracellulaire d'antibiotique qui inhibe plus de 90% de la croissance bactérienne totale du témoin sans antibiotique à 24 heures [249]. D'autres définitions de la CMIE ont été proposées :

- Higa *et al.* quantifient la croissance bactérienne par colorimétrie et définissent la CMIE comme la concentration minimale extracellulaire d'antibiotique inhibant 50% de l'effet cytopathogène à 72 h [234] ;
- Roch *et al.* quantifient la croissance de *L. pneumophila* par PCR en temps réel et définissent la CMIE comme la concentration minimale extracellulaire d'antibiotique n'autorisant aucune croissance intracellulaire à 72 heures [229].

2.2.3.3 Apport des méthodes intracellulaires

Les méthodes extracellulaires placent les bactéries dans des conditions artificielles en les exposant directement aux antibiotiques dans des conditions standardisées de pH, de concentrations en nutriments, d'atmosphère, etc.. Les méthodes intracellulaires permettent d'évaluer l'activité des antibiotiques en mimant davantage les conditions physiopathologiques de l'infection. Elles considèrent de nombreux paramètres non explorés par les méthodes extracellulaires, comme la pénétration de l'antibiotique dans la cellule, sa diffusion jusqu'au phagosome, sa potentielle inactivation ou sa séquestration dans un compartiment autre que le phagosome, l'environnement au sein du phagosome (notamment le pH), la concentration intracellulaire et le *fitness* de *L. pneumophila*. Ainsi, les discordances entre CMI et CMIE particulièrement marquées pour les β -lactamines et les aminosides peuvent être expliquées.

2.2.3.4 Activité intracellulaire des principaux antibiotiques

Il existe relativement peu de données relatives à l'activité intracellulaire des antibiotiques sur *Legionella* eu égard à son mode de multiplication (Tableau 8). En effet, la CMIE des antibiotiques n'est que rarement déterminée, les études intracellulaires étant réalisées à des concentrations relatives aux CMI, ce qui introduit d'emblée un biais méthodologique lorsque l'on compare les macrolides (ratio CMIE/CMI > 1) à certaines fluoroquinolones (ratio CMIE/CMI < 1).

Ces études montrent qu'à des concentrations supérieures aux CMI :

- les fluoroquinolones et la rifampicine sont plus efficaces que l'érythromycine pour inhiber la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* [225, 235, 252, 253] ;
- parmi les macrolides, l'azithromycine et la clarithromycine sont plus actives que l'érythromycine sur les légionelles intracellulaires [236, 238].

Pour des concentrations inférieures aux CMI, seules les fluoroquinolones exercent un effet inhibiteur sur la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* [224]. Ceci est en accord avec les autres données de la littérature car les CMIE des fluoroquinolones testées dans cette étude sont inférieures à leur CMI (Tableau 8).

Pour mimer les conditions physiopathologiques de l'infection, Tano *et al.* ont proposé un modèle cinétique où des cellules infectées par *L. pneumophila* étaient mises en contact avec une concentration d'antibiotique initiale égale au pic sérique d'antibiotique chez l'Homme [254]. Une dialyse adaptée à la demi-vie de l'antibiotique mime la décroissance de la concentration sérique de celui-ci sur 24 heures. L'activité de la moxifloxacine persiste après dialyse témoignant d'un effet post-antibiotique ou une bactéricidie rapide. La dialyse de l'érythromycine s'accompagne d'une multiplication intracellulaire de *L. pneumophila*, ce qui témoigne d'une action bactériostatique et d'une absence d'effet post-antibiotique. Des données similaires sont retrouvées par Horwitz *et al.* et Baltch *et al.* [225, 255].

Parmi les macrolides, l'azithromycine, à concentration égale au pic sérique, exerce un effet bactéricide sur les légionelles intracellulaires [256].

Enfin, à la CMIE, la rifampicine, comme l'érythromycine, est bactériostatique sur les *L. pneumophila* intracellulaires [255].

2.2.3.5 Contraintes et limites

Ces techniques nécessitent la maîtrise de la culture cellulaire et l'entretien d'une lignée dans une pièce dédiée afin d'éviter toute contamination des lignées. L'étude de l'activité intracellulaire des antibiotiques sur *L. pneumophila* reste ainsi réservée à des laboratoires spécialisés. Si les méthodes intracellulaires proposent une approche plus séduisante que les méthodes extracellulaires pour l'étude de la sensibilité de *L. pneumophila* aux antibiotiques, des différences considérables de CMIE peuvent être observées pour un même antibiotique en fonction du type cellulaire infecté car l'activité phagocytaire, la perméabilité membranaire aux antibiotiques et le *fitness* intracellulaire peuvent varier. C'est par exemple le cas des CMIE des macrolides déterminées sur cellules monocytaires THP-1 ou cellules épithéliales A-549 [233].

Tableau 8. CMIE (mg/L) de la rifampicine, des macrolides et fluoroquinolones pour *L. pneumophila*. Les ratios CMIE/CMI sont exprimés entre parenthèses.

Référence bibliographique	Type cellulaire	Rifampicine	Macrolides			Fluoroquinolones		
			Erythro.	Clarithro.	Azithro.	Lévoflox.	Ciproflo.	Moxiflox.
Roch <i>et al.</i> [229]	THP-1	≤ 0,001 (ND)	4 (4)			0,016 (0,5)	0,03 (1)	0,03 (0,5)
Takemura <i>et al.</i> [232]	THP-1	0,002 (8)	0,5 (1)	0,032 (1)	0,064 (0,5)		0,016 (1)	
Kunishima <i>et al.</i> [233]	THP-1		1 (4)	0,032 (1)			0,032 (2)	
	A-549		0,063 (0,25)	0,008 (0,25)			0,063 (4)	
Higa <i>et al.</i> [234]	J774.1	0,004 (2)	1 (8)	0,031 (1)	0,5 (8)	0,016 (0,25)	0,063 (2)	
Vildé <i>et al.</i> [249]	Monocytes humains (sang périphérique)	0,005 (ND)		0,05 (ND)				

(ND) Non déterminé

2.2.4 Modèle animal

L'activité des antibiotiques peut être étudiée expérimentalement sur un modèle animal tel que le cobaye ou la souris DBA/2 [257]. L'infection animale est effectuée par inoculation intratrachéale [258, 259], intranasale [257] ou par inhalation d'un aérosol de *L. pneumophila* [260]. Les antibiotiques sont administrés par voie intrapéritonéale, intraveineuse ou orale. Les concentrations sériques et pulmonaires des antibiotiques peuvent être dosées [261]. La survie animale et les examens anatomo-pathologiques et bactériologiques du tissu pulmonaire permettent d'évaluer l'activité des antibiotiques.

Les résultats obtenus sur modèle animal sont corrélés à ceux des méthodes intracellulaires *in vitro* :

- bien que possédant une CMI basse, les β -lactamines et les aminosides sont inactifs *in vivo* sur *L. pneumophila* [258, 262] ;
- les fluoroquinolones sont plus efficaces que l'érythromycine [261, 263, 264] ; la lévofloxacine induit une réduction significative de la concentration bactérienne pulmonaire dès le premier jour suivant l'initiation de l'antibiothérapie [257] ;
- parmi les macrolides, l'azithromycine est plus efficace que la clarithromycine et l'érythromycine [260, 265] ; son activité est égale à celle de la lévofloxacine [266] ;
- l'activité anti-*L. pneumophila* de la rifampicine est inférieure à celle des fluoroquinolones ; en comparaison avec l'érythromycine, son activité reste plus controversée [258, 261].

2.2.5 Etude des associations d'antibiotiques

2.2.5.1 Méthodologie

La valeur de l'association est mesurée par le calcul de l'index FIC (*Fractional Inhibitory Concentration*) (figure 7):

$$\text{FIC index} = \frac{\text{CMI}_{A/B}}{\text{CMI}_A} + \frac{\text{CMI}_{B/A}}{\text{CMI}_B}$$

où CMI_A : CMI de l'antibiotique A

CMI_B : CMI de l'antibiotique B

$\text{CMI}_{A/B}$: CMI de l'antibiotique A en présence de l'antibiotique B

$\text{CMI}_{B/A}$: CMI de l'antibiotique B en présence de l'antibiotique A

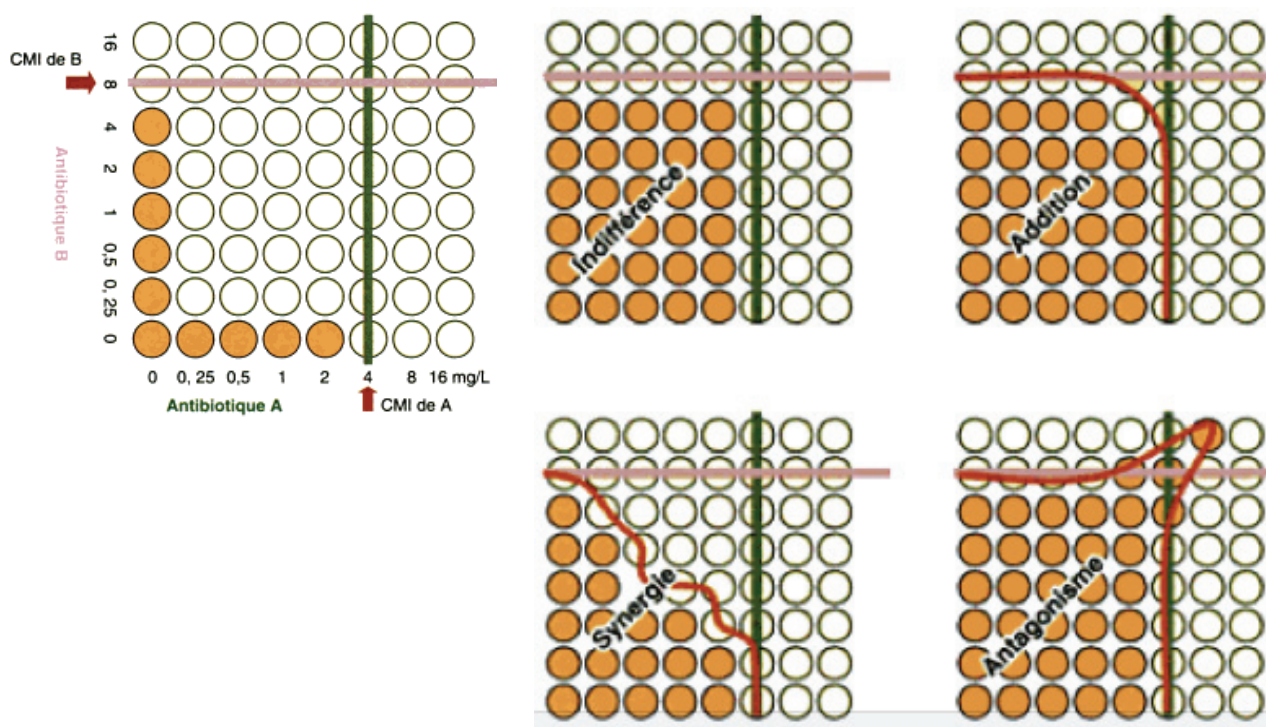


Figure 7. Etude des associations d'antibiotiques : technique de l'échiquier, d'après Denis, Ploy *et al.* 2007 [267]

Puits présentant une croissance bactérienne en orange, puits sans croissance bactérienne en blanc.

Il existe différentes méthodes d'interprétation des associations par la méthode de l'échiquier [268]. Une synergie est définie par l'absence de croissance bactérienne dans les puits contenant $0,25 \times \text{CMI}$ et $2 \times \text{CMI}$ (ou $\text{FIC} \leq 0,5$). Un antagonisme est défini par une croissance bactérienne dans ces deux puits (ou $\text{FIC} > 4$), un effet additif par un $\text{FIC} = 1$ et une indifférence par un FIC compris entre 1 et 4.

Baltch *et al.* concluent à une synergie lorsque deux antibiotiques, utilisés à $0,5 \times$ leur CMI, induisent une inhibition bactérienne de 2 log par rapport aux antibiotiques utilisés seuls [227].

Martin *et al.* définissent une synergie partielle pour un FIC compris entre 0,5 et 0,75, un effet additif pour un FIC compris entre 0,76 et 1 et une indifférence pour un FIC compris entre 1 et 4 [239]. Les mêmes auteurs, en 1997, ont défini un effet additif pour un FIC compris entre 0,5 et 1, la notion de synergie partielle n'apparaissant plus [231]. Moffie *et al.* définissent l'antagonisme pour un FIC supérieur à 2 [244].

Par ailleurs, parmi les méthodes intracellulaires, à l'exception des travaux de Vildé *et al.*, les CMIE ne sont pas déterminées [132, 252, 269, 270].

Ainsi, les disparités méthodologiques d'une étude à une autre peuvent en partie expliquer les discordances de résultats entre auteurs pour une même association. A cela s'ajoute la nature de la souche testée, puisque plusieurs auteurs ont montré que l'effet des associations était souche-dépendant.

Une revue des principales études évaluant l'impact des associations d'antibiotiques sur *L. pneumophila* est présentée dans le tableau 9.

2.2.5.2 Association fluoroquinolone – macrolide

Les associations entre fluoroquinolones et macrolides ont été étudiées par des méthodes extracellulaires sur de nombreuses souches de *L. pneumophila* [226, 231, 239, 244]. Elles sont représentées en rouge dans le tableau 9. La plupart des associations a montré un effet additif ou une indifférence.

Les données sur les associations fluoroquinolones - macrolides par méthode intracellulaire sont plus restreintes. Si Baltch *et al.* concluent à une indifférence, les résultats obtenus sur l'association lévofloxacine - érythromycine semblent difficilement interprétables en raison d'une absence de détermination préalable des CMIE des deux antibiotiques [252].

De plus, l'étude est réalisée en un point de concentration égale à 10 x la CMI. Les données de la littérature rapportent une CMI supérieure à la CMIE pour la lévofloxacine. Il est donc très probable que la concentration de lévofloxacine testée soit bien supérieure à sa CMIE, et donc non adaptée à l'étude d'une synergie. Enfin, l'étude de Vildé *et al.* montre un effet additif entre péfloxacinine et érythromycine par la méthode de l'échiquier [269].

Au total, les données de la littérature rapportent un effet indifférent ou additif pour les associations entre fluoroquinolones et macrolides. L'effet de l'association semble être à la fois antibiotique et souche-dépendant.

2.2.5.3 Association fluoroquinolone – rifampicine

Les associations entre fluoroquinolones et rifampicine sont représentées en violet dans le tableau 9. Par méthode extracellulaire, l'étude de Baltch *et al.* menée sur 56 souches conclut à une synergie entre lévofloxacine ou ofloxacine et rifampicine à 0,5 x leur CMI [227]. Cependant, l'index FIC calculé est égal à 1 ; il s'agirait donc plutôt d'un effet additif. Par contre, une synergie est observée entre lévofloxacine et rifampicine pour des concentrations à 0,25 x leur CMI (FIC = 0,5). Par la méthode de l'échiquier, avec un index FIC égal à 1,21, Moffie *et al.* observent une indifférence entre ciprofloxacine et rifampicine [244].

Par méthode intracellulaire, ces associations sont indifférentes, mais les résultats sont discutables puisque les CMIE n'ont pas été déterminées au préalable [252, 270]. Dans l'étude d'Havlichek *et al.*, l'inhibition de la croissance bactérienne étant supérieure avec la ciprofloxacine ou la rifampicine seules plutôt qu'en association (à des concentrations supérieures aux CMI), l'hypothèse de l'antagonisme pourrait être émise [270]. Les travaux de Vildé *et al.* montrent, eux, un effet additif entre péfloxacin et rifampicine [249].

Des études réalisées sur le cobaye (ciprofloxacine - rifampicine) ne montrent pas de différence entre monothérapie et bithérapie [259].

Au total, les différentes publications sur l'association fluoroquinolone – rifampicine apportent des résultats très hétérogènes.

2.2.5.4 Association macrolide – rifampicine

L'association entre macrolides et rifampicine est l'association la moins utilisée en thérapeutique et également la moins documentée dans la littérature. L'érythromycine est le seul macrolide qui ait été évalué en association avec la rifampicine. Les résultats des différentes études sont représentés en vert dans le tableau 9.

Par méthode extracellulaire, en fonction des études et des souches testées, l'association érythromycine - rifampicine semble additive ou indifférente (rarement synergique) [227, 244].

Deux études intracellulaires ont été menées sans détermination préalable des CMIE des deux antibiotiques [227, 252, 270] ; les résultats sont donc difficilement interprétables. Les travaux de Vildé *et al.* montrent un effet additif pour cette association, avec un index FIC à 0,6 [249]. Ce résultat n'est pas confirmé par une étude sur modèle animal [258].

Au total, l'association érythromycine – rifampicine semble être additive ou indifférente. Un effet synergique est observé sur quelques souches de *L. pneumophila*. A notre connaissance, les associations de la rifampicine avec d'autres macrolides comme la clarithromycine ou l'azithromycine n'ont pas été évaluées sur un modèle intracellulaire.

2.2.5.5 Modèle animal

Si de nombreux travaux sur un modèle animal ont permis d'évaluer l'activité des antibiotiques utilisés seuls sur *Legionella*, les associations d'antibiotiques ont été peu étudiées (Tableau 9). L'addition de la rifampicine à l'érythromycine ou à la ciprofloxacine ne semble pas modifier l'activité de l'antibiotique seul. Une bithérapie n'aurait donc pas d'intérêt par rapport à une monothérapie. Aucun antagonisme n'a été rapporté [258, 259].

Tableau 9. Revue des publications portant sur l'effet des associations d'antibiotiques sur *L. pneumophila*

Article	Méthodologie	Associations évaluées	Index FIC	Interprétation de l'auteur	Remarques
Martin <i>et al.</i> [231]	Extracellulaire Dilution en BCYE (échiquier) 31 souches	Ciprofloxacine - clarithromycine	2 (90%), 1 (10%)	Indifférence ou addition	
		Ciprofloxacine – clarithromycine et métabolite	0,6 25 – 1 (97%), 2 (3%)	Addition ou indifférence	1. Milieu inhibant l'activité des antibiotiques
		Lévofloxacine - clarithromycine	0,6 25 – 1 (87%), 2 (13%)	Addition ou indifférence	2. Effet des associations souche - dépendant
Martin <i>et al.</i> [239]	Extracellulaire Dilution en BCYE (échiquier) 34 souches cliniques	Lévofloxacine – clarithromycine et métabolite	2 (3%), 0,56 – 1 (94%), ≤ 0,5 (3%)	Indifférence, addition ou synergie	
		Ciprofloxacine - érythromycine	0,75 - 2	Synergie partielle ou indifférence (86% des souches)	
		Lévofloxacine - érythromycine	0,56 - 2	Synergie partielle ou indifférence (90% des souches)	1. Milieu inhibant l'activité des antibiotiques
		Ciprofloxacine - clarithromycine	1 - 2	Indifférence	2. Effet des associations souche – dépendant
Martin <i>et al.</i> [239]	Extracellulaire Dilution en BCYE (échiquier) 34 souches cliniques	Lévofloxacine - clarithromycine	0,625 - 2	Synergie partielle ou indifférence	3. Notion de synergie partielle = indifférence selon les bonnes choisies
		Ciprofloxacine - azithromycine	0,375 - 2	Synergie (6% des souches), synergie partielle ou indifférence	pour l'index FIC
		Lévofloxacine - azithromycine	0,5 - 2	Synergie (15% des souches), synergie partielle ou indifférence	

Article	Méthode	Associations évaluées	Index FIC	Interprétation de l'auteur	Remarques
Baltch <i>et al.</i> [227]	Extracellulaire Associations testées à 0,5 et 0,25 x CMI en bouillon BYE, 56 souches cliniques et environnementales	Lévofloxacine - rifampicine	ND	Synergie à 0,5 x CMI et à 0,25 x CMI de chaque antibiotique	1. Synergie définie par une diminution de <i>L. pneumophila</i> de 2 log par rapport à l'antibiotique seul à 0,5 ou 0,25 x la CMI 2. A 0,5 x CMI, index FIC = 1 donc plutôt addition que synergie 3. Synergie entre érythromycine et rifampicine à 0,25 x CMI non mentionnée 4. La lévofloxacine ou la rifampicine seules à 0,5 x leur CMI induisent une diminution de 4 log
		Ofloxacine - rifampicine	ND	Synergie à 0,5 x CMI	
Barker <i>et al.</i> [226]	Extracellulaire Associations testées à la CMB, en bouillon LBYE	Ciprofloxacine - rifampicine	ND	Indifférence	Associations dans le but de détecter une synergie, mais des concentrations d'antibiotiques testées supérieures aux CMI
		Ciprofloxacine - érythromycine	ND	Indifférence	
		Erythromycine - rifampicine	ND	Indifférence	
Moffie <i>et al.</i> [244]	Extracellulaire Dilution en BYE (échiquier) 20 souches cliniques	Ofloxacine - rifampicine	1,05	Indifférence	Effet des associations souche - dépendant
		Erythromycine - rifampicine	1,21	Indifférence	
		Erythromycine - rifampicine	< 0,5 (4 souches) 0,5 - 2	Synergie ou indifférence	

Article	Méthode	Associations évaluées	Index FIC	Interprétation de l'auteur	Remarques
Baltch <i>et al.</i> [252]	Intracellulaire (monocytes de donneurs humains) Associations testées en un point à 10 x la CMI Souche Lp1 L-1033	Lévofloxacine - érythromycine	ND	Pas d'intérêt	1. Absence de détermination des CMIE 2. Associations dans le but de détecter une synergie, mais concentrations d'antibiotiques testées supérieures aux CMI
		Lévofloxacine - rifampicine	ND	Pas d'intérêt	
		Erythromycine - rifampicine	ND	Pas d'intérêt	
Havlicek <i>et al.</i> [270]	Intracellulaire (monocytes de donneurs humains) Associations testées en un point > CMI Souche Lp1 ATCC 33152	Ciprofloxacine - rifampicine	ND	Pas de synergie	1. Absence de détermination des CMIE 2. Associations dans le but de détecter une synergie, mais concentrations d'antibiotiques testées supérieures aux CMI 3. Activité de (ciprofloxacine + rifampicine) inférieure à celle de ciprofloxacine ou rifampicine seule : antagonisme ?
		Erythromycine - rifampicine	ND	Pas de synergie	
Vildé <i>et al.</i> [249]	Intracellulaire (monocytes de donneurs humains) Détermination des CMIE Echiquier Souches Lp1	Péfloxacine - érythromycine	1	Addition	
		Péfloxacine - rifampicine	1,5	Addition	
		Erythromycine - rifampicine	0,6	Addition	
Havlicek <i>et al.</i> [259]	Modèle animal (cobaye)	Ciprofloxacine - rifampicine	-	Identique à une monothérapie par ciprofloxacine ou rifampicine	Indifférence
Edelstein <i>et al.</i> [258]	Modèle animal (cobaye)	Erythromycine - rifampicine	-	Identique à une monothérapie par érythromycine ou rifampicine	Indifférence

2.2.6 Données cliniques

Les études cliniques sont difficilement réalisables du fait notamment de la faible incidence de la légionellose. Leurs principaux objectifs sont de comparer l'activité des fluoroquinolones et des macrolides et d'étudier l'impact clinique des associations d'antibiotiques.

La littérature recense de nombreuses études rétrospectives et cinq études prospectives observationnelles d'effectif important qui ont comparé l'activité des macrolides *versus* quinolones [79, 94, 271-273]. On ne note pas de différence significative entre macrolides et quinolones concernant les complications cliniques et la mortalité. Par contre, il existe une tendance ou une différence significative en faveur des fluoroquinolones concernant le délai de stabilisation clinique, le délai d'obtention de l'apyrexie et la durée de séjour [79, 94, 274, 275]. De plus, les macrolides semblent être associés à une fréquence de complications (toxicité hépatique, phlébites) plus élevée que les fluoroquinolones.

Les associations d'antibiotiques ont été moins étudiées en clinique [271, 276-278]. A l'exception de l'étude de Rello *et al.*, toutes les données publiées ne montrent aucun bénéfice aux bithérapies [279]. Les associations comprenant de la rifampicine sont associées à un allongement de la durée d'hospitalisation, une toxicité hépatique accrue et des interactions médicamenteuses chez les patients polymédicamentés.

Le tableau 10 recense les différentes études cliniques menées durant ces dernières années. Les études portant sur les associations d'antibiotiques sont présentées en bleu.

Tableau 10. Revue des principales études cliniques comparant différentes antibiothérapies dans le traitement de la légionellose.

Référence bibliographique	Type d'étude clinique	Nombre de patients	Antibiotiques étudiés	Conclusions
Rello <i>et al.</i> [274]	Prospective	25	Lévofloxacine ou clarithromycine ± rifampicine	Taux de mortalité inférieure si bithérapie
Viasus <i>et al.</i> [79]	Prospective	214	Lévofloxacine <i>versus</i> azithromycine ou clarithromycine	Lévofloxacine : tendance à stabilisation clinique plus rapide, et durée d'hospitalisation + courte
Griffin <i>et al.</i> [274]	Rétrospective	39	Lévofloxacine <i>versus</i> azithromycine ou clarithromycine	Lévofloxacine : tendance à stabilisation clinique plus rapide, et durée d'hospitalisation + courte
Nakamura <i>et al.</i> [278]	Rétrospective	22	Fluoroquinolone + macrolide <i>versus</i> fluoroquinolone <i>versus</i> macrolide	Pas de différence significative en terme de durée de traitement, durée d'hospitalisation et mortalité
Grau <i>et al.</i> [276]	Rétrospective	32	Clarithromycine <i>versus</i> Clarithromycine + rifampicine	Durée d'administration de la rifampicine proportionnelle à la durée d'hospitalisation et à l'augmentation de la bilirubine. Pas de bénéfice.
Falco <i>et al.</i> [272]	Prospective	113	Lévofloxacine <i>versus</i> azithromycine ou clarithromycine	Pas de différence significative pour le temps d'obtention de l'apyrexie, la durée d'hospitalisation et la mortalité
Haragana <i>et al.</i> [201]	Rétrospective	27	Ciprofloxacine <i>versus</i> érythromycine	Tendance à une obtention de l'apyrexie, une diminution de la CRP et des leucocytes plus rapide avec la ciprofloxacine
Blazquez-Garrido <i>et al.</i> [271]	Prospective	292	Lévofloxacine <i>versus</i> clarithromycine Lévofloxacine <i>versus</i> lévofloxacine + rifampicine	Lévofloxacine <i>versus</i> clarithromycine : pas de différence en terme d'évolution clinique, moins de complications, durée d'hospitalisation + courte. Addition de rifampicine : augmentation de la durée d'hospitalisation, des complications et des effets secondaires hépatiques
Mykietluk <i>et al.</i> [94]	Prospective	120	Lévofloxacine <i>versus</i> érythromycine ou clarithromycine	Lévofloxacine : délai de stabilisation clinique, temps pour obtention de l'apyrexie et durée de la toux significativement plus courts. Tendance à hospitalisation + courte
Sabria <i>et al.</i> [273]	Prospective	130	Lévofloxacine ou ofloxacine <i>versus</i> érythromycine ou clarithromycine	Fluoroquinolones : délai pour obtention de l'apyrexie plus court, tendance à durée d'hospitalisation plus courte. Pas de différence significative pour complications et mortalité
Benito <i>et al.</i> [277]	Rétrospective	97	Erythromycine ± rifampicine <i>versus</i> Clarithromycine ± rifampicine	Clarithromycine : + de phlébites qu'érythromycine Pas de différence significative entre mono- et bithérapies

3 Les macrolides

L'érythromycine, chef de file des macrolides, a été isolée chez l'actinomycète *Streptomyces erythreus* duquel elle tire son nom. Elle fut commercialisée dès 1952 et indiquée dans le traitement des infections à cocci à Gram positif chez les patients allergiques à la pénicilline. D'autres macrolides hémi-synthétiques tels que l'azithromycine ou la clarithromycine ont ensuite été développés dans l'objectif :

- d'améliorer le profil pharmacocinétique ;
- de diminuer les effets indésirables ;
- de diminuer les interactions médicamenteuses ;
- d'étendre le spectre d'action des macrolides aux bactéries à Gram négatif [280, 281].

3.1 Structure

Les macrolides présentent une structure chimique constituée d' :

- un macrocycle aglycone fermé par une fonction lactone (d'où leur nom) comprenant 14, 15 ou 16 atomes de carbone ;
- un sucre neutre (ou cladinose) et un sucre aminé (ou désosamine) qui se substituent à ce cycle.

Ils peuvent être classés en fonction (Tableau 11) :

- du nombre d'atomes de carbone (14, 15 ou 16) présents sur ce cycle lactone ;
- de leur caractère naturel (érythromycine, spiramycine, josamycine) ou hémi-synthétique ; en effet, la plupart des macrolides sont synthétisés par des espèces de *Streptomyces* et d'autres actinomycètes du sol, mais il existe des macrolides hémi-synthétiques obtenus par modification chimique des molécules naturelles ;
- du type de modification chimique apportée à l'érythromycine pour les macrolides hémi-synthétiques :
 - o modifications du substituant seul : clarithromycine, roxithromycine ;
 - o modifications de l'aglycone : azithromycine ;
 - o modification des sucres.

Les macrolides à 14 atomes de carbone (C14) sont constitués d'un cycle lactone possédant une fonction cétone, substitué par un sucre neutre en C3 et un sucre aminé en C5 (Figure 8) [282-284].

L'azithromycine, unique macrolide à 15 atomes de carbone (C15), diffère par la nature de son macrocycle : perte de la fonction cétone et introduction d'un atome d'azote en position N10. Elle possède les mêmes sucres que les macrolides à 14 atomes de carbone.

Les macrolides à 16 atomes de carbone (C16) sont substitués non pas par un sucre en C3 mais par un disaccharide désosamine / sucre neutre en position C5. La miocamycine et la rokitamycine sont obtenues à partir de deux macrolides naturels, la midécamycine et la leucomycine. Parmi les macrolides à 16 atomes de carbone, seule la spiramycine possède un sucre additionnel, le forosamine, en position C9 du cycle lactone (Figure 8).

Tableau 11. Classification des macrolides selon le nombre d'atomes de leur macrocycle.

14 atomes de Carbone	15 atomes de Carbone	16 atomes de Carbone
Erythromycine *		Spiramycine *
Oléandomycine *		Josamycine *
Clarithromycine	Azithromycine	Midécamycine *
Roxithomycine		Carbomycine *
Dirithromycine		Miocamycine
		Rokitamycine

* macrolide d'origine naturelle

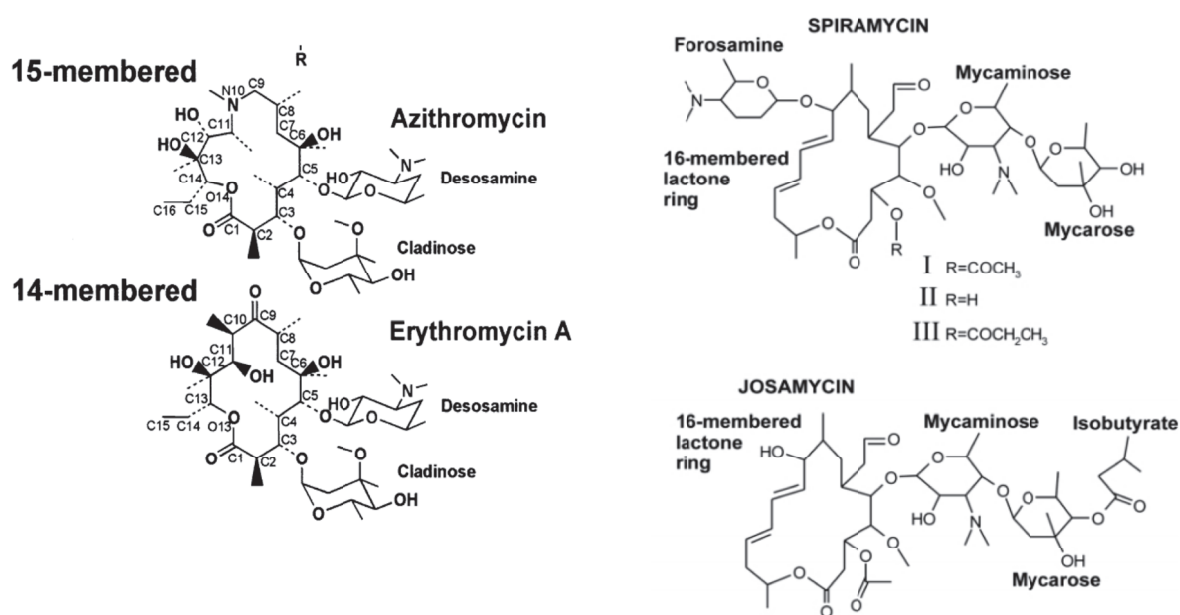


Figure 8. Structure chimique de macrolides, adapté d'après Hansen *et al.* [285] et Tenson *et al.* [282].

3.2 Propriétés pharmacocinétiques

3.2.1 Erythromycine

L'érythromycine base est caractérisée par une mauvaise biodisponibilité voisine de 25%. Celle-ci est d'autant plus diminuée qu'elle est administrée pendant les repas. En effet, la fonction cétonique du cycle macrolactone lui confère une instabilité en milieu acide avec une dégradation en métabolites inactifs. Des formulations gastro-résistantes sont donc nécessaires pour empêcher une inactivation par l'acide gastrique. La demi-vie de l'érythromycine est courte, de 1,5 à 3 heures, ce qui impose des administrations répétées [286].

Sa tolérance digestive est mauvaise et les effets indésirables gastro-intestinaux fréquents (nausées, vomissements, diarrhées) limitant son administration *per os*. L'injection de la formulation IV est douloureuse et des cas de phlébites ont été rapportés.

Comme tous les macrolides, son métabolisme est hépatique (déméthylation par le cytochrome P450) et son élimination principalement biliaire.

3.2.2 Clarithromycine

La clarithromycine présente des propriétés pharmacocinétiques supérieures à l'érythromycine. Le groupement méthoxyle en C6 du macrocycle (remplaçant le groupement hydroxyle de l'érythromycine) prévient sa dégradation acide dans l'estomac, améliore sa biodisponibilité (55%), sa tolérance après administration orale et son activité antibactérienne. La clarithromycine se concentre dans le surfactant pulmonaire quatre fois plus que l'érythromycine [286]. Elle pénètre cependant moins bien que l'azithromycine dans les macrophages alvéolaires [287-289]. Enfin, elle est le seul macrolide à posséder un métabolite actif, la 14-hydroxy-clarithromycine et à présenter un effet post-antibiotique *in vitro* [230, 231].

3.2.3 Azithromycine

Bien que sa biodisponibilité soit modérée (37%), l'azithromycine présente d'excellentes propriétés pharmacocinétiques ce qui la distingue des autres macrolides. Les concentrations sériques d'azithromycine sont faibles, toujours inférieures à 1 mg/L. Les concentrations intracellulaires sont quant à elles jusqu'à 200 fois supérieures aux concentrations sériques pour les macrophages et jusqu'à 4000 fois pour les fibroblastes pulmonaires qui jouent le rôle de réservoir. Sa demi-vie est comprise entre 48 et 96 heures. De plus, à la différence des autres macrolides, elle n'est pas métabolisée par le cytochrome

P450 ce qui réduit les interactions avec les autres molécules comme la rifampicine ou les immunosuppresseurs [288, 290, 291].

3.2.4 Autres macrolides

Les données de la littérature portant sur les propriétés pharmacocinétiques des autres macrolides sont plus restreintes et sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12. Caractéristiques pharmacocinétiques des principaux macrolides [280, 288, 290, 292-296].

	Quantité administrée <i>per os</i> (mg)	Biodisponibilité (%)	C _{max} sérique (mg/L)	t(h) du pic sérique	Volume de distribution (L/kg)	t _{1/2} (h)
Erythromycine	250	25	1,9 – 3,7	1 – 5	0,64	1,5 – 3
Azithromycine	500	37	0,4 – 0,45	2 – 3	23 - 31	48 - 96
Clarithromycine	250	55	1 – 6,8	1,7 – 1,9	2 - 4	6,8
Roxithromycine	150	75	5,4 – 7,9	1,5 – 2	-	11
Dirithromycine	500	6 – 14	0,1 – 0,6	4 – 4,5	5	16 – 60
Spiramycine	6 (MU)	36	1,2	2	4,5	6,2 – 8
Josamycine	500	-	1,2	0,3 – 2	-	2

3.3 Activité anti-microbienne

Les macrolides, antibiotiques bactériostatiques, sont indiqués dans le traitement de nombreuses infections :

- infections hautes et basses des voies respiratoires dues aux bactéries à Gram positif ainsi qu'à *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella* spp, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ;
- infections de la peau et des tissus mous ;
- infections sexuellement transmissibles dues à *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* ou *Ureaplasma urealyticum* ;
- infections dues à *Bordetella*, *Bartonella*, *Campylobacter*, *Mycobacterium avium - intracellulare*...
- infections dues à des eucaryotes comme *Toxoplasma gondii*...

Ils sont inactifs sur la plupart des entérobactéries, les bacilles à Gram négatif non fermentants et la plupart des bacilles anaérobies à Gram négatif.

3.4 Mécanisme d'action

En se liant aux ribosomes bactériens, les macrolides inhibent la synthèse protéique.

3.4.1 Le ribosome bactérien, cible des macrolides

Le ribosome traduit l'information génétique codée par l'ARN messager (ARNm) pour assembler les acides aminés en protéines. La découverte de son rôle central dans la synthèse protéique dans les années 1950 a été le point de départ de recherches intensives sur son mode de fonctionnement et sur les mécanismes d'inhibition par les antibiotiques.

Escherichia coli a été le premier modèle d'étude du ribosome. La forme et les dimensions de ses ribosomes ont d'abord été visualisées en microscopie électronique, puis les données ont été affinées par des cryo-techniques et de la cristallographie/diffraction aux rayons X sur une *Archae*, *Haloarcula marismortui*, permettant une résolution de l'ordre de quelques angströms [297-299].

3.4.1.1 Structure générale et fonction

Le ribosome bactérien est une enzyme complexe constituée d'ARN et de plus de 50 protéines qui représentent respectivement 2/3 et 1/3 du ribosome. La préservation de sa fonction essentielle, la synthèse des protéines, explique sa structure très conservée durant l'évolution phylogénétique entre procaryotes et eucaryotes.

Le ribosome bactérien est constitué de deux sous-unités [300] :

- la grande sous-unité ou sous-unité 50S, d'une masse de 1,5 MDa, comprenant les ARN ribosomiaux (ARNr) 23S et 5S (3000 nucléotides) et 34 protéines ribosomiales (L1 à L34) ;
- la petite sous-unité ou sous-unité 30S, d'une masse de 0,8 MDa, comprenant l'ARNr 16S (1500 nucléotides) et 21 protéines ribosomiales (S1 à S21).

Les ARN ribosomiaux 5S, 16S et 23S sont codés par des opérons. Le nombre de copies de ces opérons est variable selon les espèces (Tableau 13). L'ensemble des protéines ribosomiales est également codé par des opérons répartis sur tout le chromosome bactérien. Par exemple, l'opéron S10 code 11 protéines ribosomiales dont les protéines L4 et L22 de la grande sous-unité ribosomiale [301].

La petite sous-unité 30S permet l'interaction entre les codons de l'ARNm et les anticodons de l'ARNt. Elle contient le site de « décodage » où l'ARNm est lu par groupe de 3 nucléotides appelés codons. Chaque codon désigne un des 20 acides aminés et chaque acide aminé est convoyé vers le ribosome par un ARN de transfert (ARNt). Les ARNt possèdent une séquence anti-codon qui rend spécifique l'association entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt.

La grosse sous-unité contient le centre peptidyl-transférase qui catalyse la formation des liaisons peptidiques sur le peptide néosynthétisé.

Les deux sous-unités contiennent 3 sites de liaison pour l'ARNt (Figure 9) :

- le site A (*acceptor*) lie l'aminoacyl-ARNt qui va être incorporé à la chaîne polypeptidique ;
- le site P (*peptidyl*) positionne le peptidyl-ARNt ;
- le site E (*exit*) est occupé par les ARNt désacétylés avant leur dissociation du ribosome.

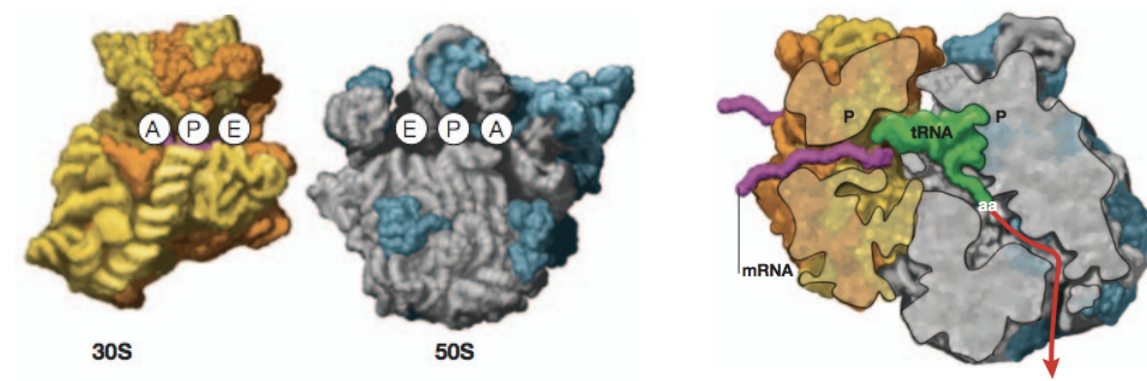


Figure 9. Structure et fonctionnement du ribosome de *Thermus thermophilus*, d'après Poehlsgaard *et al.* [302]

L'ARN est représenté en jaune et gris, les protéines en orange et bleu.
A : acceptor site, P : peptidyl site, E : exit site

Tableau 13. Nombre d'opérons de l'ARNr 23S par genre ou espèce bactérienne, adapté d'après Vester *et al.* [303]

Organisme	Nombre d'opérons d'ARNr
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1
<i>Coxiella burnetii</i>	1
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1
<i>Mycobacterium avium</i>	1
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1
<i>Mycobacterium leprae</i>	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
<i>Mycoplasma genitalium</i>	1
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1
<i>Propionibacterium avidum</i>	1
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1
<i>Bartonella henselae</i>	2
<i>Borrelia burgdorferi</i>	2*
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2
<i>Helicobacter pylori</i>	2
<i>Leptospira interrogans</i>	2
<i>Mycobacterium celatum</i>	2
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	2**
<i>Mycoplasma hominis</i>	2
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2
<i>Treponema pallidum</i>	2
<i>Ureaplasma spp</i>	2
<i>Bordetella pertussis</i>	3
<i>Brucella</i>	3
<i>Campylobacter jejuni</i> – <i>C. coli</i>	3
<i>Legionella pneumophila</i>	3
<i>Propionibacterium acnes</i>	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
<i>Moraxella catarrhalis</i>	4
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	4
<i>Neisseria meningitidis</i>	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
<i>Enterococcus spp</i>	4 - 6
<i>Haemophilus influenzae</i>	6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	6
<i>Listeria monocytogenes</i>	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6
<i>Salmonella spp</i>	7
<i>Bacillus cereus</i> groupe	6 - 10
<i>Clostridium perfringens</i>	9
<i>Vibrio cholerae</i>	9

* une copie du gène codant l'ARNr 16S, deux copies du gène codant l'ARNr 23S

** un opéron des gènes codant les ARNr, plus un groupe 16S – 23S

Le processus de synthèse protéique comporte trois étapes qui sont l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Lors de la synthèse protéique, l'ARNm passe à travers deux canaux étroits de la petite sous-unité ribosomale 30S pour être présenté à l'interface de décodage (site A) où il interagit avec l'ARNt anti-codon. Lors de l'initiation de la synthèse protéique, le codon initiateur de l'ARNm atteint directement le site peptidique (site P) de la petite sous-unité et interagit avec l'ARNt initiateur portant un acide aminé méthionine. La petite et grande sous-unité entrent alors en contact. L'élongation peut être alors initiée. Au cours de cette étape, le ribosome se déplace le long de l'ARNm. L'attachement de l'aminoacyl-ARNt se fait au niveau du site A. Ce choix est facilité par le facteur d'élongation Tu (EF-Tu ou EF1) et implique deux étapes distinctes. L'anticodon de l'ARNt reconnaît le codon correspondant sur l'ARNm présent dans le site A, puis leur appariement est en quelque sorte communiqué au centre GTPase situé dans la grande sous-unité, ce qui induit une hydrolyse du GTP lié au facteur EF-Tu, une libération du facteur EF-Tu de l'ARNt et du ribosome et un positionnement de l'acide aminé de l'ARNt dans le centre peptidyl-transférase rapidement suivi par la formation d'une liaison peptidique dans le site A. La translocation des ARNt et de l'ARNm vers les sites P et E est facilitée par la liaison de la GTPase *elongation factor G* (EF-G ou EF2). L'ARNt désacétylé est décalé du site P vers le site E et le peptidyl-ARNt du site A vers le site P lors de l'hydrolyse du GTP. L'ARNt désacétylé du site E est libéré lorsqu'un nouvel aminoacyl-ARNt se fixe sur le site A (Figure 10).

Ce cycle en trois étapes est répété et la chaîne peptidique s'allonge à partir du site P vers le site E de la grande sous-unité ribosomale jusqu'à l'étape de terminaison où le ribosome décode un codon stop sur l'ARNm. Le nouveau peptide est alors libéré et les deux sous-unités ribosomales se dissocient.

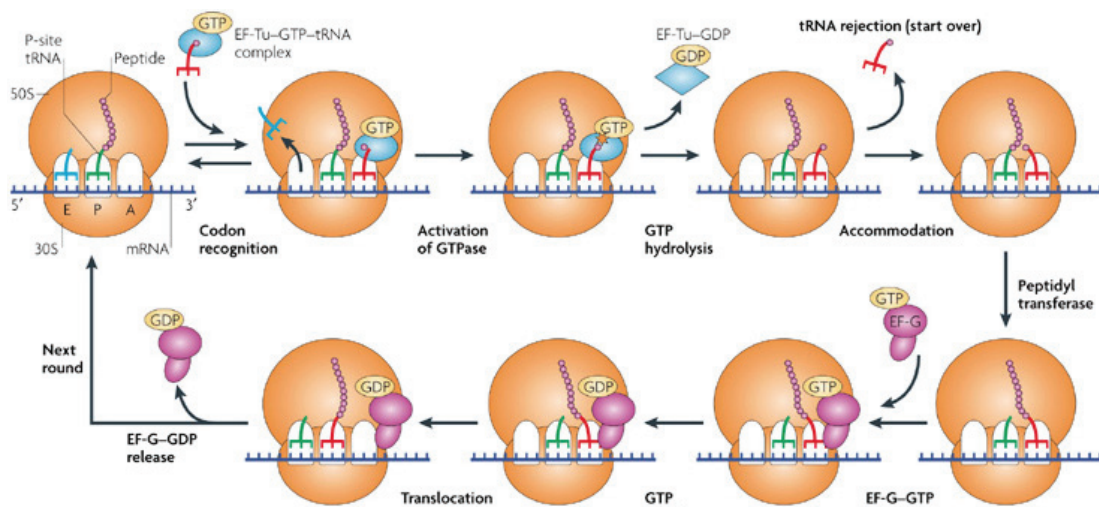


Figure 10. Vue globale de la synthèse protéique par le ribosome, d'après Steitz *et al.* [300].

3.4.1.2 L'ARN ribosomal

Les études structurales sur le ribosome ont montré que la région à l'interface des deux sous-unités ribosomales est très riche en ARN et pauvre en protéines [302]. La structure de la grande sous-unité révèle que le ribosome est un ribozyme avec l'ARNr 23S au centre de son activité peptidyl-transférase qui catalyse la formation des liaisons peptidiques.

Les ARN ribosomaux se replient par appariement de bases complémentaires adoptant ainsi leur structure secondaire. La structure secondaire de l'ARNr 23S comprend 101 hélices réparties en 6 domaines, chacun ayant une structure tertiaire très asymétrique (Figure 11). Malgré leurs contours très irréguliers, ces domaines s'assemblent en une masse compacte d'ARN qui reste isométrique. Les domaines V et II forment le centre peptidyl-transférase. La nature du nucléotide en position 2058 (domaine V), une adénine, est très conservée parmi les genres bactériens.

3.4.1.3 Les protéines ribosomales

Elles sont dispersées quasiment partout dans la structure, mais principalement concentrées sur la surface du ribosome (Figure 9). Elles sont caractérisées par la structure étendue et irrégulière de leurs boucles qui émergent sur les côtés et l'arrière des sous-unités ribosomales et de leurs extrémités qui s'étendent jusqu'au cœur des sous-unités pour interagir avec l'ARNr. Elles sont absentes des régions capitales pour la synthèse protéique : interface avec la sous-unité 30S et site actif peptidyl-transférase. Les protéines ribosomales les plus proches du centre peptidyl transférase sont les protéines L2, L3, L4 et L10 (Figure 12) [304]. Les protéines ribosomales permettent à l'ARNr d'adopter une conformation nécessaire à sa fonctionnalité. Associées à l'ARNr, elles stabilisent sa structure tridimensionnelle [302].

3.4.1.4 Le tunnel de sortie du polypeptide

Le tunnel de sortie peptidique de la sous-unité 50S fait approximativement 100 angströms de longueur. Son diamètre varie de 10 à 20 angströms. Il est relativement droit, à l'exception d'un coude distant de 20 à 35 angströms du centre peptidyl-transférase. A cet endroit, le tunnel présente également une zone de constriction de 12 angströms formée par les protéines L4 et L22 [305].

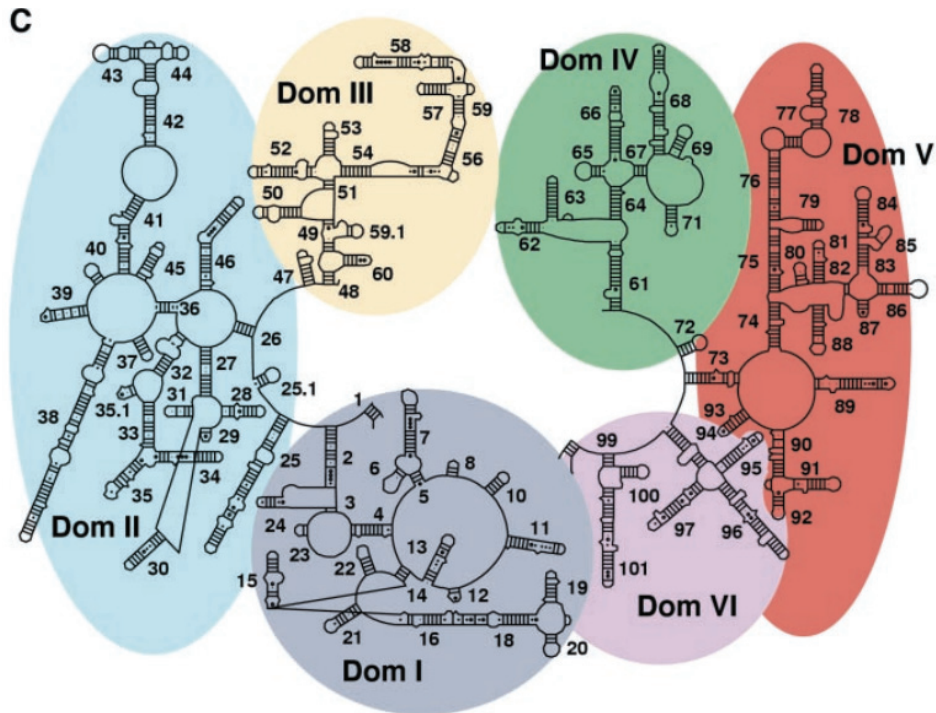


Figure 11. Structure secondaire de l'ARN ribosomal 23S, d'après Ban *et al.* [299].

Les six domaines catalytiques sont numérotés de I à VI.

Les structures tiges - boucles sont numérotées de 1 à 101.

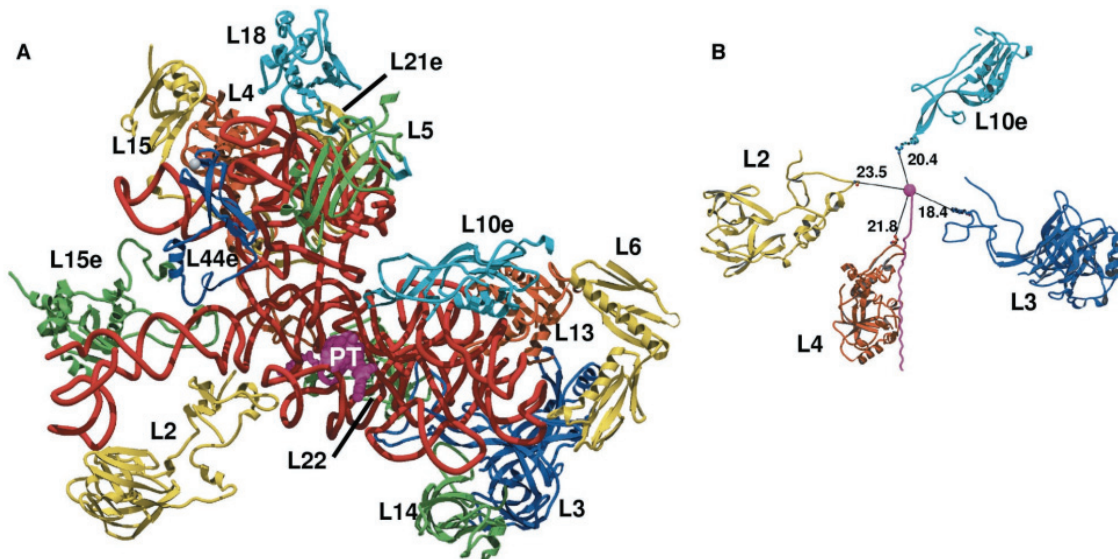


Figure 12. Protéines ribosomales de la sous-unité 50S.

(A) Assemblage des protéines ribosomales autour du centre peptidyl-transférase. (B) Vue du centre peptidyl-transférase sans l'ARNr 23S. Les distances en angströms entre les protéines les plus proches et le centre peptidyl-transférase sont annotées, d'après Poulsen *et al.* [304].

La paroi interne de ce tunnel est très irrégulière et bordée principalement par de l'ARN (domaines I à V), mais les régions non globulaires des protéines L4, L22 et L39 sont présentes dans des proportions significatives [304]. En particulier, les boucles des protéines L4 (acides aminés 62 à 67 chez *E. coli*) et L22 (acides aminés 88 à 93) atteignent le tunnel vers une zone de constriction formant un coude où elles sont en lien étroit avec l'ARN. Cette zone se situe à proximité du site de liaison des macrolides (Figures 13 et 14) [302].

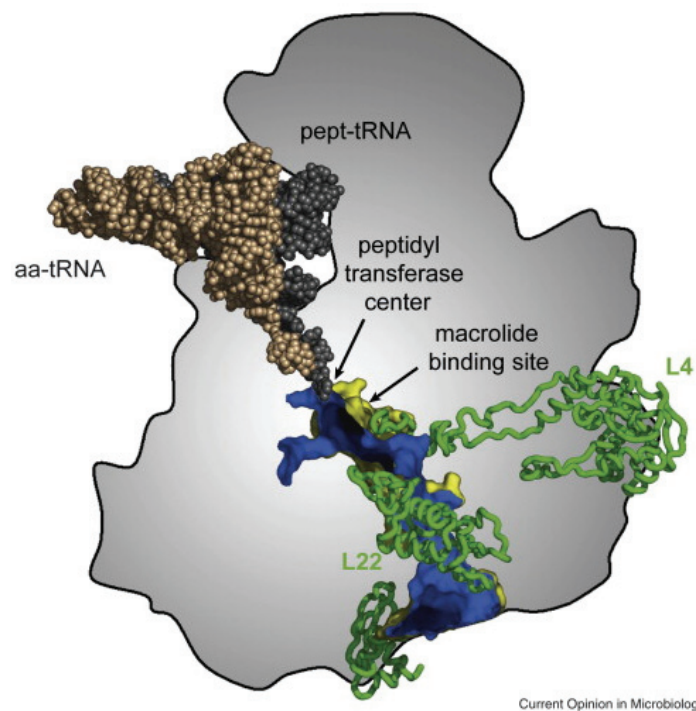


Figure 13. Coupe transversale de la sous-unité ribosomale 50S, montrant le tunnel d'élongation peptidique, d'après Mankin [306].

Les surfaces interne et externe du tunnel sont respectivement représentées en bleu et jaune.

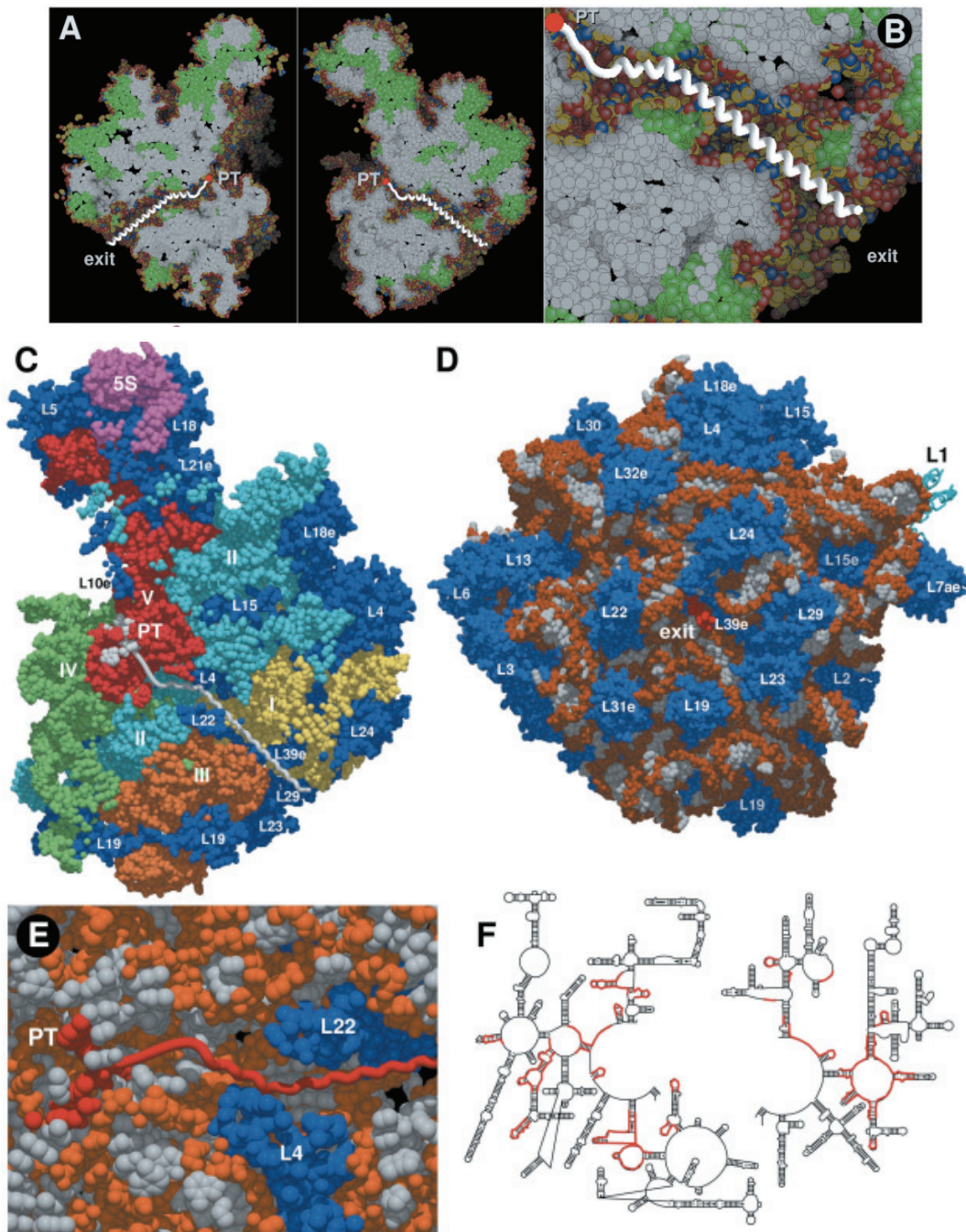


Figure 14. Sous-unité 50S et tunnel d'élongation polypeptidique, d'après Nissen *et al.* [304]

(A) Coupe transversale de la sous-unité 50S. L'ARN et les protéines qui sont absentes de la surface du ribosome sont représentés respectivement en blanc et vert. Atomes de surface de l'ARN et des protéines en jaune (carbone), rouge (oxygène), bleu (azote). PT, centre peptidyl transférase. Peptide en blanc. (B) Constriction et coudure du tunnel par les protéines L4 et L22 (en vert). L'extrémité du tunnel est relativement large. (C) La surface interne du tunnel est représentée. Domaines I (jaune), II (turquoise), III (orange), IV (vert), V (rouge) de l'ARN 23S, ARN 5S (rose), protéines (bleu). (D) Représentation de la sous-unité 50S à la sortie du tunnel. ARN en gris et orange, protéines en bleu, polypeptide en rouge. (E) Première partie du tunnel montrant la proximité entre le centre peptidyl transférase (PT) et les protéines L4 et L22 (bleu). (F) Structure secondaire de l'ARNr 23S identifiant les séquences à proximité du tunnel en rouge.

3.4.2 Interaction macrolide – ribosome

Le site de liaison des macrolides aux ribosomes se trouve dans la grande sous-unité ribosomale, dans le premier tiers du tunnel de sortie du polypeptide, à une distance de seulement 10 angströms du centre peptidyl-transférase. Le passage aisé des protéines à travers ce tunnel est crucial pour une synthèse protéique efficace. Lorsque le macrolide est lié, la largeur du tunnel diminue de 18-19 angströms à 10 angströms, ce qui empêche la progression du peptide et résulte en une inhibition de la synthèse protéique par dissociation prématurée du peptidyl-ARNt à partir du ribosome. Ce blocage intervient précocement après l'initiation de la synthèse protéique. La spiramycine et la josamycine induisent une dissociation du peptidyl-ARNt après une élongation d'un peptide de 2, 3 ou 4 acides aminés tandis que l'érythromycine, qui n'atteint pas directement le centre peptidyl-transférase en raison d'un seul sucre en position C5 du cycle lactone, autorise la synthèse d'un polypeptide de 6, 7 ou 8 AA avant la dissociation de l'ARNt [282, 307].

Secondairement, l'accumulation de peptidyl-ARNt dans la cellule entraîne une déplétion du pool d'ARNt disponibles et est toxique pour la cellule.

Un second mécanisme d'action important a été décrit plus récemment. La formation de nouveaux ribosomes nécessite l'assemblage coordonné des ARNr et de nombreuses protéines ribosomales pour créer deux sous-unités. Les macrolides interagissent avec les sous-unités 50S en cours d'assemblage et bloquent ce processus, ce qui induit leur dégradation par des ribonucléases [308].

3.4.2.1 Interactions macrolide – ARNr 23S

Les macrolides interagissent avec la boucle centrale du domaine V qui constitue le centre peptidyl-transférase et l'épingle 35 du domaine II de l'ARNr 23S. Tous bloquent indirectement cette activité peptidyl-transférase. Les macrolides en C16 (spiramycine, josamycine) possèdent un disaccharide en position C5 sur le cycle lactone qui inhibe directement l'activité peptidyl-transférase en interférant avec les substrats de la peptidyl-transférase [283, 284, 304].

Les interactions entre le cycle lactone des macrolides et l'ARNr 23S sont les suivantes (Figures 15, 16 et 17) [283, 284] :

- le cycle lactone se lie à la paroi du tunnel par des interactions hydrophobes avec les nucléotides 2058, 2059 et la paire de bases 2057-2611 du domaine V ;
- il établit également des interactions hydrophobes avec les nucléotides 2062 et 2609 ;
- il interagit par des interactions hydrophobes avec le domaine II de l'ARNr, en particulier au niveau de la tige 35 et du nucléotide A752.

Il existe également des interactions entre les sucres des macrolides et l'ARNr 23S :

- les sucres en position C5 sur le cycle lactone (désosamine ou mycaminose) sont plus en avant vers le centre peptidyl-transférase ; ils établissent des interactions hydrophobes avec la cavité peptidyl-transférase ; le groupement 2'OH du désosamine établit des interactions hydrogène avec les atomes d'azote des nucléotides 2058 et 2059 (numérotation de *E. coli*) de l'ARN ribosomal ;
- le sucre désosamine interagit ou non avec le nucléotide 2057, qui forme la dernière paire de base de l'hélice 73 du domaine V de l'ARNr, en fonction de sa nature (adénine pour *D. radiodurans*, guanine pour *E. coli*) ; le nucléotide 2057 semble principalement engagé dans le maintien de la conformation du nucléotide 2058 ;
- les sucres mycarose et mycaminose interagissent par des liaisons hydrogène avec le nucléotide 2505 ;
- le mycarose est indispensable à l'interaction avec le nucléotide 2506 et l'inhibition de la formation de liaison peptidique [304] ;
- pour les macrolides en C16, le groupement éthyl-aldéhyde en position C6 du cycle lactone forme une liaison covalente avec l'atome d'azote N6 du nucléotide 2062 [283] ;
- le sucre cladinose des macrolides en C14 n'est pas impliqué dans la liaison du macrolide à l'ARNr 23S, tandis que celui de l'azithromycine interagit avec la base 2505 [283].

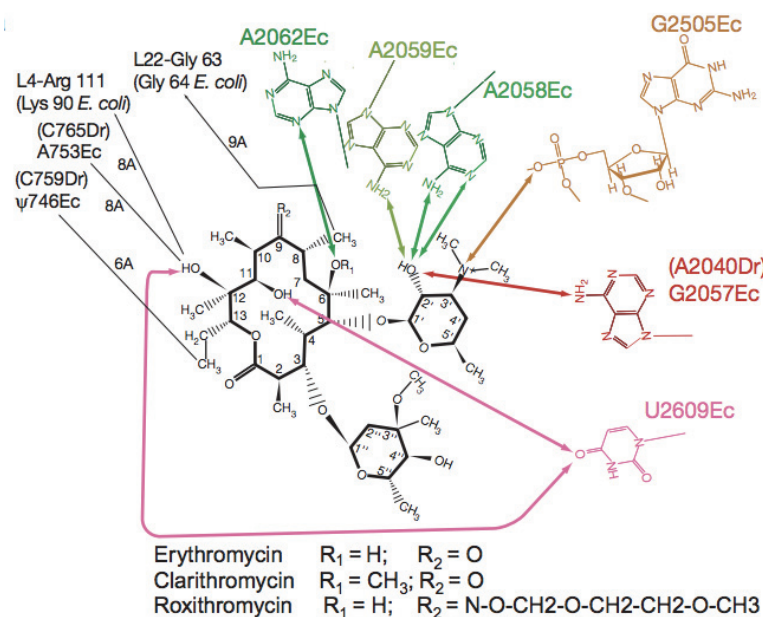


Figure 15. Interactions des macrolides (érythromycine, clarithromycine, roxithromycine) avec les nucléotides de la cavité peptidyl-transférase (en couleur) et les protéines ribosomales L4 et L22. Les flèches colorées indiquent une distance inférieure à 4,4 angströms.

D'après Schlunzen *et al.* [284].

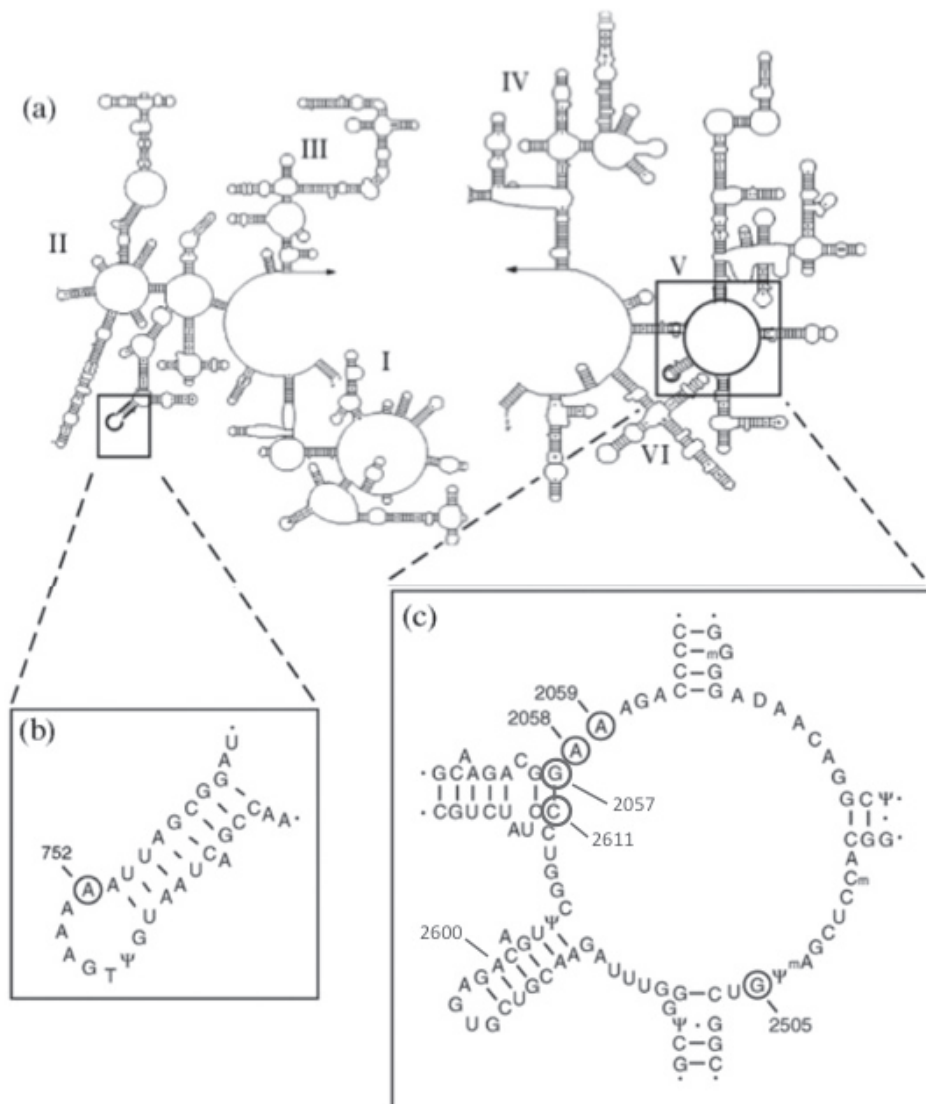


Figure 16. Tige 35 du domaine II et boucle centrale du domaine V de l'ARNr 23S montrant les nucléotides (numérotation d'*E. coli*) impliqués dans l'interaction avec les macrolides.

Adapté d'après Douthwaite *et al.* [308].

3.4.2.2 Interaction macrolide – protéines ribosomales

Les distances les plus faibles entre les protéines L4 et L22 et le macrolide sont respectivement de 8 et 9 angströms ce qui est trop important pour générer des interactions directes. La résistance induite par des mutations sur les protéines ribosomales serait donc une conséquence indirecte d'une modification de la structure tridimensionnelle du ribosome.

Il existe cependant quelques exceptions :

- la spiramycine présente un sucre forosamine en position 9 du cycle lactonique qui lui permet d'interagir avec la protéine L4 ;
- deux molécules d'azithromycine peuvent se loger simultanément dans le tunnel et ainsi interagir par des liaisons hydrogène entre la protéine L4 (Thr 64 et Gly60) et le sucre cladinose et le cycle lactone, et par des interactions hydrophobes entre la protéine L22 (Arg111) et les sucres cladinose et désosamine [309].

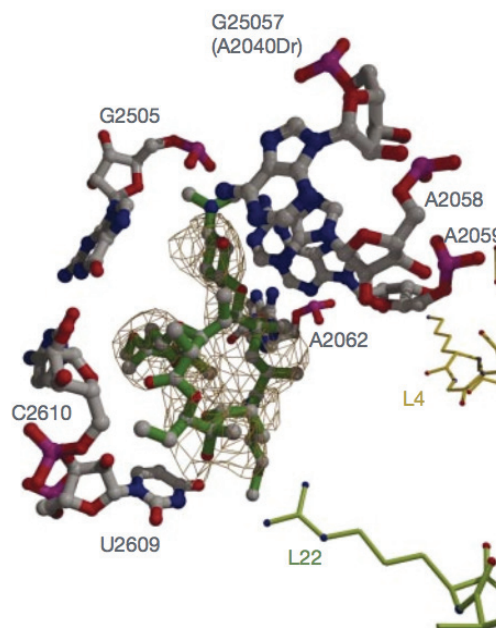


Figure 17. Site de liaison de la roxithromycine dans la cavité peptidyl-transférase de *Deinococcus radiodurans*, d'après Schlunzen *et al.* [284].

L'antibiotique est représenté en vert, une partie des protéines L4 et L22 en jaune et vert clair, La numération des nucléotides est effectuée selon la séquence de *E. coli*.

3.5 Les kétolides, une nouvelle classe de macrolides

Les kétolides sont des dérivés héli-synthétiques de l'érythromycine formant une classe à part de macrolides. Le chef de file est la télithromycine, commercialisée depuis 2001 sous le nom de Ketek® (Sanofi-Aventis). Un second kétolide, la céthromycine ou ABT 773 (Abbott) est approuvée par la FDA depuis 2009 (Figure 18).

Les kétolides sont caractérisés par la présence d'une fonction cétone en remplacement du sucre cladinose en position C3 du cycle lactone, d'où le nom de « kétolides ». Ils présentent également un groupement méthoxyle en position C6 et un cycle carbamate substitué en

position C11-C12 du cycle en remplacement des groupements hydroxyles. La suppression du cladinose diminue l'activité antimicrobienne du composé mais elle est compensée par les modifications sur les autres positions du macrocycle lactone. Comme la clarithromycine, le groupement méthoxyle en position C6 stabilise sa structure chimique en milieu acide et améliore ses propriétés pharmacocinétiques.

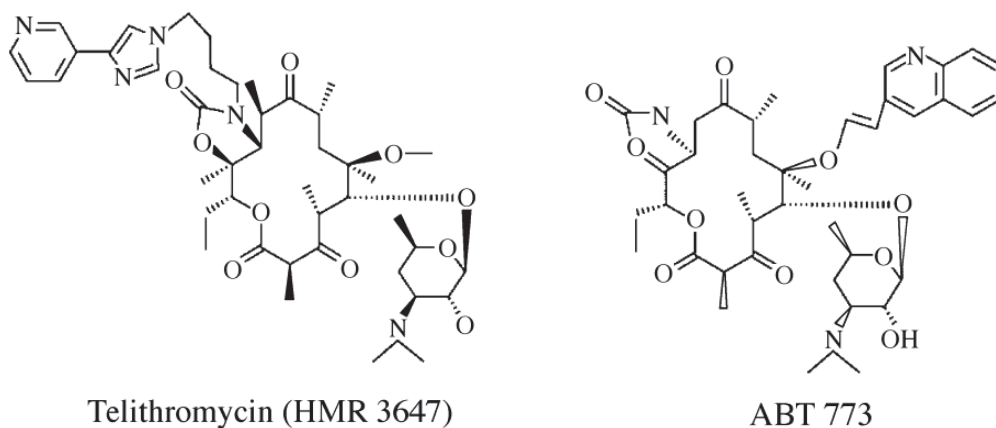


Figure 18. Structure chimique de la télithromycine et de la céthromycine (ABT 773).
D'après Douthwaite *et al.* [308].

Les interactions des kétolides avec l'ARNr 23S sont de même nature que celles de l'érythromycine et de la clarithromycine, c'est-à-dire avec les nucléotides 2058, 2059, 2505 du domaine V. Cependant, leur affinité est deux fois plus forte. En raison du cycle carbamate, les kétolides présentent une interaction additive avec le nucléotide A752 de la boucle 35 du domaine II de l'ARNr [308].

Les kétolides restent actifs sur la plupart des souches bactériennes présentant une résistance à l'érythromycine par modification du site de liaison aux macrolides. L'interaction des kétolides avec le domaine II de l'ARNr 23S joue probablement un rôle clé dans leur activité sur ces souches résistantes.

Malgré d'excellentes propriétés pharmacocinétiques et une activité anti-*Legionella* documentée, la télithromycine n'est pas recommandée dans le traitement des légionelloses, probablement du fait de l'absence de résistance aux macrolides décrite chez *Legionella* [310, 311].

3.6 Molécules apparentées aux macrolides

Elles comprennent deux familles :

- les lincosamides avec la lincomycine et son dérivé hémi-synthétique chloré, la clindamycine ;
- les streptogramines ou synergistines qui sont composées de deux molécules agissant en synergie, représentées par la pristinamycine A/B et la dalfoプリistine/quinupristine.

Ces molécules ne sont pas indiquées dans l'antibiothérapie des légionelloses. Les lincosamides présentent des CMI élevées pour *Legionella* (8 mg/L pour la clindamycine) [241]. La pristinamycine et la dalfoプリistine/quinupristine sont cependant actives sur *Legionella* avec des CMI variant de 0,06 à 1 mg/L selon les auteurs [236, 241, 312-314].

4 Mécanismes généraux de résistance aux macrolides

Nous avons vu précédemment que les macrolides avaient été introduits en thérapeutique humaine en 1952. Dès 1956, une résistance à l'érythromycine était rapportée chez *Staphylococcus*. Depuis, un grand nombre de mécanismes de résistance aux macrolides a été identifié. Cette dernière partie sera consacrée à la description des mécanismes impliqués dans la résistance aux macrolides :

- modification de la cible par méthylation de l'ARNr 23S ou mutations sur les gènes codant l'ARNr 23S et les protéines ribosomales ;
- efflux du macrolide ;
- inactivation enzymatique.

4.1 Modification de la cible

4.1.1 Méthylation de l'ARNr 23S

Plus d'une trentaine de gènes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*) codant une ARNr méthylase qui ajoute un ou deux groupements méthyle sur l'adénine 2058 de l'ARNr 23S sont décrits chez des bactéries à Gram positif ou négatif [315]. La plupart de ces gènes sont associés à des transposons conjugatifs ou non qui tendent à rester intégrés dans les chromosomes bien que certains soient retrouvés dans des plasmides. Ils sont souvent associés à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques comme le gène *tet* qui confère une résistance aux tétracyclines [316].

Ce mécanisme de résistance est retrouvé dans de nombreuses espèces : *Staphylococcus* spp [317], *Pasteurella multocida* [318], *Neisseria meningitidis* [319], *Neisseria gonorrhoeae* [320], *Haemophilus influenzae* [321], *Lactobacillus* spp [322], *Mycobacterium* spp [323-325]. La di-méthylation de l'atome d'azote N6 du nucléotide 2058 ajoute un substituant volumineux provoquant un encombrement stérique pour la liaison du macrolide. De plus, elle empêche la formation de liaisons hydrogène entre l'ARNr 23S et le groupement 2'OH du sucre désosamine. Ces deux mécanismes empêchent la liaison du macrolide au ribosome et entraînent une résistance bactérienne aux macrolides.

Les conséquences de cette méthylation diffèrent en fonction du nombre de groupements méthyle ajoutés [326] :

- la mono-méthylation confère un phénotype MLS_B I avec une résistance faible à modérée aux macrolides et aux streptogramines, une résistance élevée aux lincosamides mais aucune résistance aux kétolides ;
- la di-méthylation confère un phénotype MLS_B II avec une haute résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines B et kétolides [327].

4.1.2 Modification de l'ARNr 23S ou des protéines ribosomales

En règle générale, une résistance par mutation dans l'ARNr 23S est rapportée pour des bactéries avec un faible nombre de copies de l'opéron 16S – 23S – 5S. La résistance chez des bactéries possédant de multiples opérons comme *Enterococcus* spp, *Streptococcus* spp (4 opérons) et *Staphylococcus aureus* (6 opérons) est davantage conférée par une méthylation de l'adénine 2058 ou par un efflux actif de l'antibiotique.

Des mutations dans des gènes codant l'ARNr 23S ont cependant été rapportées pour *S. aureus* chez des patients atteints de mucoviscidose et recevant des macrolides au long cours (3 à 4 opérons présentaient une substitution en 2058 ou 2059) [328] et pour *Streptococcus pneumoniae* (positions 2058, 2059, 2611) [329, 330].

Le tableau 14 répertorie les mutations dans le gène *rrn* associées à des résistances aux macrolides. Les mutations répertoriées à ce jour concernent principalement le domaine V et plus rarement le domaine II de l'ARNr 23S. Cependant, des mutations ont été observées dans d'autres domaines comme le domaine III pour *Streptococcus pneumoniae* [329].

Nous décrivons aussi bien les mutations identifiées sur des souches isolées à partir de prélèvements cliniques que celles observées sur des souches sélectionnées *in vitro*.

Ces mutations n'induisent pas de résistance croisée à d'autres familles antibiotiques.

4.1.2.1 Domaine V - nucléotide 2058

Nous avons vu précédemment que le nucléotide 2058 est hautement conservé entre les genres bactériens et qu'il joue un rôle clé dans l'interaction du ribosome avec l'ARNr 23S. Les mutations sur ce nucléotide altèrent le point central d'ancrage des macrolides. La mutation A2058G a été la première mutation pour laquelle le lien avec une résistance aux macrolides a été démontré [331, 332]. C'est actuellement la substitution la plus fréquemment identifiée sur de nombreuses souches cliniques ou sélectionnées *in vitro* résistantes aux macrolides (Tableau 14). Les substitutions A2058C et A2058T confèrent également une résistance de haut niveau aux macrolides.

Notons que certaines substitutions surviennent préférentiellement. Par exemple, chez *M. pneumoniae*, la mutation A2058G est observée dans plus de 95% des cas tandis que les mutations A2058T et A2058C sont plus rares [333-336]. La mutation A2058G est responsable d'une résistance de très haut niveau à tous les macrolides tandis que la mutation A2058T induit un niveau de résistance inférieur à l'azithromycine et la clarithromycine [335].

Dans l'ensemble, les mutations en position 2058 confèrent une résistance de haut niveau à toute la famille MLS_B et aux kétolides. Lorsque la bactérie possède plusieurs opérons (*S. pneumoniae*, *Francisella tularensis*, *Ureaplasma parvum*), une résistance de haut niveau aux macrolides est induite quel que soit le nombre d'opérons mutés [330, 337-339].

4.1.2.2 Domaine V - nucléotide 2059

Les mutations sur le nucléotide 2059 confèrent également un haut niveau de résistance aux macrolides et bien que décrites moins fréquemment que les mutations en position 2058, elles ont été observées chez de nombreux genres bactériens (Tableau 14).

Chez *M. pneumoniae*, Matsuoka *et al.* ont montré que les mutations en position 2059 induisaient un niveau de résistance aux macrolides encore supérieur à celui associé aux mutations en position 2058 [336]. L'inverse est observé pour les macrolides en C14 par Ladely *et al.* pour *Campylobacter jejuni* [340] et par Devies *et al.* et Canu *et al.* pour *S. pneumoniae* [330, 341].

Chez *C. jejuni* et certaines souches de *S. pneumoniae*, le niveau de résistance est corrélé au nombre d'opérons mutés [330, 340, 342] tandis qu'il ne l'est pas pour *Staphylococcus* spp ou d'autres souches de *S. pneumoniae* [328, 341].

Tableau 14. Mutations de l'ARNr 23S associées à la résistance aux macrolides.

Position ^a	Bactérie	Isolement ^b	Mutation ^c	Phénotype ^d	Références
752	<i>S. pneumoniae</i>	L	del A752	M14, M15, Tel ^{HN}	Canu <i>et al.</i> , 2002 [341]
754	<i>E. coli</i>	L	U754A	Ery ^{BN} , Tel ^{BN}	Xiong <i>et al.</i> , 1999 [343]
792	<i>M. hominis</i>	L	G792A	M16, S _A -S _B , Tel	Pereyre <i>et al.</i> , 2006 [344]
2056	<i>M. hominis</i>	L	G2056A	Tel	Pereyre <i>et al.</i> , 2006 [344]
	<i>U. parvum</i>	L	G2056U + L4	MLSK	Pereyre <i>et al.</i> , 2007 [339]
2057	<i>E. coli</i>	L	G2057A	M14	Ettayebi <i>et al.</i> , 1985 [345]
	<i>F. tularensis</i>	L	G2057A	Ery ^{HN}	Gestin <i>et al.</i> , 2010 [338]
	<i>P. acnes</i>	C	G2057A	ML	Ishida <i>et al.</i> , 2008 [346]
	<i>U. parvum</i>	L	G2057U/A	MLSK	Pereyre <i>et al.</i> , 2007 [339]
2058	<i>B. bacilliformis</i>	L	A2058G	Ery	Biswas <i>et al.</i> , 2007 [347]
	<i>B. henselae</i>	L	A2058G	Ery, Azi	Biswas <i>et al.</i> , 2010 [348]
		C	A2058G (1 ou 2/2)	M14, M15, Tel	Biswas <i>et al.</i> , 2006 [349]
	<i>B. pertussis</i>	C	A2058G (1 ou 2/3)	M14, M15	Bartkus <i>et al.</i> , 2003 [350]
		C	A2058G	Ery	Cassiday <i>et al.</i> , 2008 [351]
		C	A2058G	M14, M15	Guillot <i>et al.</i> , 2012 [352]
	<i>C. jejuni</i>	C	A2058C	Ery	Ladely <i>et al.</i> , 2009 [340]
	<i>C. trachomatis</i>	C	A2058C	Ery, Azi, Jos	Misyurina <i>et al.</i> , 2004 [353]
		L	A2058C	M14, M15, M16	Binet <i>et al.</i> , 2007 [354]
	<i>F. tularensis</i>	L	A2058T/G (1 ou 2/3)	Ery	Gestin <i>et al.</i> , 2010 [338]
	<i>H. influenzae</i>	L	A2058G	M14, M15, CII	Clark <i>et al.</i> , 2002 [355]
		C	A2058G	Clr, Azi	Peric <i>et al.</i> , 2003 [356]
	<i>H. pylori</i>	L	A2058G/C/T	Clr	Wang <i>et al.</i> , 1998 [357]
		C	A2058G	Clr	Alfaresi <i>et al.</i> , 2010 [358]
	<i>Lactobacillus</i> spp	C	A2058G	Ery	Drago <i>et al.</i> , 2011 [359]; Begovic <i>et al.</i> , 2009 [360]

Position ^a	Bactérie	Isolement ^b	Mutation ^c	Phénotype ^d	Références
2058	<i>M. abscessus</i>	C	A2058G	Cir	Wallace <i>et al.</i> , 1996 [361]
	<i>M. avium</i>	C	A2058G/C/T	Cir	Inagaki <i>et al.</i> , 2011 [362] ; Thiemann <i>et al.</i> , 2002 [363]
	<i>M. chelonae</i>	C	A2058C/G	Cir	Wallace <i>et al.</i> , 1996 [361]
	<i>M. intracellulare</i>	C	A2058G/C/T	Cir	Jamal. <i>et al.</i> , 2000 [364]
	<i>M. kansasii</i>	C	A2058T	Cir, Azi	Burman <i>et al.</i> , 1998 [365]
	<i>M. smegmatis</i>	L	A2058G	M14, M15, M16	Li <i>et al.</i> , 2011 [366]
	<i>M. genitalium</i>	C	A2058G	M14, M15	Jensen <i>et al.</i> , 2008 [367]
	<i>M. pneumoniae</i>	C	A2058G/C	ML _{Sa}	Matsuoka <i>et al.</i> , 2004 [336]
		C	A2058G/T	M14, M15	Liu <i>et al.</i> , 2010 [333]
	<i>U. urealyticum</i>	C, L	A2058G	M14, M15, Tel	Li <i>et al.</i> , 2009 [368]
		L	A2058G	M14, M15	Liu <i>et al.</i> , 2009 [369]
	<i>P. acnes</i>	C	A2058G	ML _{Sa}	Ishida <i>et al.</i> , 2004 [346]; Ross <i>et al.</i> , 2001 [370]
	<i>S. aureus</i>	C	A2058G/T (1 ou 2/6)	ML _{Sa}	Prunier <i>et al.</i> , 2002 [328]
		L	A2058G/T (3/4)	ML, Tel	Canu <i>et al.</i> , 2002 [341]
	<i>S. pneumoniae</i>	C	A2058G (2, 3 ou 4/4)	ML, Tel ^{BN}	Farrell <i>et al.</i> , 2003 [371]
		C	A2058T (3/4) + L4	ML, Tel	
		C	A2058G (2,3 ou 4/4)	MLSK	Davies <i>et al.</i> , 2005 [330]
			A2058T	MLSK	
	<i>S. pyogenes</i>	C	A2058G (4/6)	ML _{Sa}	Jalava <i>et al.</i> , 2004 [372]
	<i>U. parvum</i>	L	A2058G (1/2)	MLSK	Pereyre <i>et al.</i> , 2007 [339]
<i>U. urealyticum</i>	C	A2058G (1/2) ± L4	Ery, Azi	Xiao <i>et al.</i> , 2011 [373]	
		A2052G + C2705T	Ery, Azi		
<i>T. denticola</i>	L	A2058G (1 ou 2/2)	Ery	Lee <i>et al.</i> , 2002 [374]	
<i>T. pallidum</i>	C	A2058G	M14, M15	Stamm <i>et al.</i> , 2000 [375]	

Position ^a	Bactérie	Isolement ^b	Mutation ^c	Phénotype ^d	Références
2059	<i>B. henselae</i>	C	A2059G	M14, M15, Tel	Biswas <i>et al.</i> , 2006 [349]
	<i>H. influenzae</i>	L	A2059C	M14, M15, CII	Clark <i>et al.</i> , 2002 [355]
	<i>H. pylori</i>	L	A2059G/C	Cir	Wang <i>et al.</i> , 1998 [357]
	<i>C. jejuni</i>	C	A2059G + L24/L22	Ery	Lehtopolku <i>et al.</i> , 2011 [376]
		C	A2059G (2 ou 3/3)	Ery	Ladely <i>et al.</i> , 2009 [340]
	<i>C. trachomatis</i>	L	A2059G/C	M14, M15, M16	Binet <i>et al.</i> , 2007 [354]
	<i>M. abscessus</i>	C	A2059G/C	Cir	Wallace <i>et al.</i> , 1996 [361]
	<i>M. avium</i>	C	A2059C	Cir	Inagaki <i>et al.</i> , 2011 [362] ; Thiermann <i>et al.</i> , 2002 [363]
	<i>M. chelonae</i>	C	A2059G	Cir	Wallace <i>et al.</i> , 1996 [361]
	<i>M. intracellulare</i>	C	A2059G/C	Cir, Azi	Jamal. <i>et al.</i> , 2000 [364]
	<i>M. genitalium</i>	C	A2059G + L4 + L22	Azi	Shimada <i>et al.</i> , 2011 [377]
		C	A2059G + L4/L22	M14, M1 5	Jensen <i>et al.</i> , 2008 [367]
	<i>M. hominis</i>	L	A2059G	ML, Tel	Pereyre <i>et al.</i> , 2006 [344]
	<i>M. pneumoniae</i>	C	A2059G	ML	Matsuoka <i>et al.</i> , 2004 [336]
		C	A2059G	M14, M15	Liu <i>et al.</i> , 2010 [333]
		C	A2059G	M14, M15, Tel	Li <i>et al.</i> , 2009 [368]
	<i>N. gonorrhoeae</i>	L	A2059G	ML, Tel	Okazaki <i>et al.</i> , 2001 [378]
	C	A2059G (3/4)	Ery, Azi	Chisholm <i>et al.</i> , 2010 [379]; Galarrza <i>et al.</i> , 2010[380]	
<i>P. acnes</i>	C	A2059G	ML	Ishida <i>et al.</i> , 2008 [346]	
<i>S. aureus</i>	C	A2059G (2 ou 3/4)	ML	Prunier <i>et al.</i> , 2002 [328]	
	L	A2059G (2,3 ou 4/4)	ML	Canu <i>et al.</i> , 2002 [341]	
<i>S. pneumoniae</i>	C	A2059G (2/4)	ML	Pihlajamali <i>et al.</i> , 2002 [329]	
	L	A2059G (2/4)	ML	Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000 [337]	
	C	A2059G (3/4)	ML	Farrell <i>et al.</i> , 2003 [371]	
	C	A2059G	ML	Davies <i>et al.</i> , 2005 [330]	

Position ^a	Bactérie	Isolement ^b	Mutation ^c	Phénotype ^d	Références
2062	<i>M. hominis</i>	L	A2062G (1/2)	M16	Furneri et al., 2001 [381]
			A2062T (2/2)	M16	
		L	A2062C (1/2) + L4	M16, S _A -S _B , Tel	Pereyre et al., 2006 [344]
	<i>M. pneumoniae</i>	L	A2062G	M16, S _A -S _B	Pereyre et al., 2004 [382]
			A2062G + L4	M16, S _A -S _B	
2503	<i>M. smegmatis</i>	L	A2503T	Spi, Jos	Li et al., 2011 [366]
2504	<i>M. smegmatis</i>	L	A2504G	Spi, Jos ^{BN}	Li et al., 2011 [366]
2576	<i>M. hominis</i>	L	G2576T	M16 ^{BN} , L ^{BN}	Pereyre et al., 2006 [344]
2160-64	<i>H. influenzae</i>	C	A2160T + A2058G	Clr, Azi	Peric et al., 2003 [356]
			A2160T + L4	Clr, Azi	
			2160GGA => TAT + L22	Clr, Azi	
			C2164G + L4 + L22	Clr, Azi	
2609	<i>E. coli</i>	L	T2609C	Tel	Garza-Ramos et al., 2001 [383]
2610	<i>S. pneumoniae</i>	L	C2610T	ML, Tel ^{BN}	Canu et al., 2002 [341]
2611	<i>B. henselae</i>	C	A2059G	M14, M15, Tel	Biswas et al., 2006 [349]
		C	T2611C	Ery, Azi, Jos	Misyurina et al., 2004 [353]
	<i>C. trachomatis</i>	L	C2611T	Ery	Vester et al., 2001 [303]
		L	C2611T	Ery ^{HN}	Gestin et al., 2010 [338]
	<i>F. tularensis</i>	L	C2611T	Clr	Rimbara et al., 2008 [384]
	<i>H. pylori</i>	L	2611A		
	<i>N. gonorrhoeae</i>	C	C2611T (3/4)	Ery, Azi	Ng et al., 2002 [385]; Chisholm et al., 2010 [379]
<i>M. hominis</i>	C	C2611T + A2059G	ML, Tel	Pereyre et al., 2002 [386]	
<i>M. pneumoniae</i>	L	C2611A ± L22	M14, M15, Tel	Pereyre et al., 2004 [382]	
		C2611A + L4 + L22	M, Tel		
	L	C2611A (3/4)	M14 ^{BN} , M15, M16, S _B	Tait-Kamradt et al., 2000 [337]	
<i>S. pneumoniae</i>	L	C2611G (4/4)	M14, M15, L, S _B , Tel		

Position ^a	Bactérie	Isolement ^b	Mutation ^c	Phénotype ^d	Références
2611	<i>S. pneumoniae</i>	L	C2611T (2 ou 4/4)	M15	Canu et al., 2002 [341]
			C2611A (3/4) + L22	M14, M15, TeI	
			C2611G (3/4)	M14, M15, Q-D	Farrell et al., 2004 [342]
			C2611A (4/4)	M14, M15, L, S _B , Q-D	

^a Numérotation selon l'ARNr 23S de *E. coli*

^b C, souche clinique ; L, souche sélectionnée en laboratoire

^c nombre de copies entre parenthèses ; + L4 et/ou L22, mutation supplémentaire dans la protéine ribosomale L4 et/ou L22

^d phénotype de résistance mentionné dans la publication

M, macrolides ; M14, M15, M16, macrolides à 14, 15 ou 16 atomes de carbone ; L, lincosamides ; S_A, streptogramines A ; S_B, streptogramines B ; Ety, érythromycine ; Azi, azithromycine, Clr, clarithromycine ; Tel, télicithromycine ; Jos, josamycine ; Spi, spiramycine ; Cli, clindamycine ; Q-D, quinupristine-dalfopristine

^{BN}, bas niveau de résistance ; ^{HN}, haut niveau de résistance

Del, délétion ; Ins, insertion

Néanmoins, ces mutations en position 2059 restent associées à un haut niveau de résistance aux macrolides. La sensibilité de *M. pneumoniae* et *S. pneumoniae* aux kétolides ne semble pas affectée par les mutations en position 2059 [330, 337, 341, 342].

4.1.2.3 Domaine V - nucléotides 2057 et 2611

Ces substitutions entraînent un désappariement de la paire de base 2057-2611 située à la jonction de la structure tige/boucle adjacente au centre peptidyl-transférase du macrolide et un élargissement de la boucle centrale du domaine V de l'ARNr 23S. Ces mutations sont retrouvées chez de nombreux genres bactériens et le degré de résistance est toujours inférieur à celui observé avec des mutations sur les nucléotides 2058 ou 2059 [303, 338, 339, 379, 382, 384, 387]. Les CMI des macrolides en C14 sont augmentées. La résistance est moins marquée sur les macrolides en C15 et C16.

Chez *Mycoplasma hyopneumoniae*, la présence d'une adénine en place d'une guanine en position 2057 explique une résistance intrinsèque aux macrolides en C14. Chez *M. hominis* également naturellement résistant aux macrolides en C14 et C15, la mutation C2611U restaure sa sensibilité à l'érythromycine et l'azithromycine car elle induit une fermeture de la tige précédant la partie simple brin de la boucle de la peptidyl-transférase et la création de la paire de bases A2057-U2611 à proximité immédiate de la boucle du domaine V [344].

Chez *F. tularensis*, le degré de résistance est corrélé au nombre de copies mutées [338].

4.1.2.4 Domaine V - autres nucléotides

Des mutations sur les nucléotides qui se trouvent à proximité des bases 2058 et 2059 sur la structure secondaire mais légèrement en dehors de la zone centrale d'interaction des macrolides confèrent un niveau de résistance aux macrolides inférieur, en particulier aux macrolides en C16 (Tableau 14) :

- mutations sur les nucléotides 2503 et 2504 chez *M. smegmatis* ;
- mutations sur le nucléotide 2062G décrite chez *M. pneumoniae*, *M. hominis* et *S. pneumoniae* ;
- le rôle de la mutation T2182C (nucléotide 2098 chez *E. coli*) chez *Helicobacter pylori* est très controversé ; elle serait associée à un niveau de résistance identique à celui observé avec la mutation A2143C (nucléotide 2059 chez *E. coli*) [388] ; d'autres mutations ont été identifiées comme potentiellement associées à la résistance à la clarithromycine : nucléotides 1855, 1858, 2031, 2057, 2060, 2063, 2307, 2308, 2329, 2373 (domaine V) [389-392] ;

- mutation en position 2609 chez *E. coli* ;
- mutations en position 2610 et 2613 chez *S. pneumoniae*.

4.1.2.5 Associations de mutations sur le domaine V

Chez de nombreuses espèces, ces mutations peuvent se cumuler sur une même copie de l'opéron ou sur des copies distinctes :

- nucléotides 2058 (1 copie/2) et 2059 (1 copie/2) chez *Mycoplasma gallisepticum*, responsable d'une résistance à la tylosine et tilmicosine [393] ;
- mutations G2057A (1/2) + A2059G (1/2) chez *Mycoplasma gallisepticum* [342, 394] ;
- mutations G2057A (4/4) + A2059G (3/4) chez *S. pneumoniae* [342] ;
- mutations A2058G et C2605T chez *Mycoplasma pneumoniae* (1 opéron) [334] ;
- mutations A2058C et C2611G chez *M. pneumoniae* [336] ;
- mutations A2058C et A2059G sur la même copie d'ADN chez *Campylobacter jejuni* [395] ;
- mutations A2058C et T2611C chez *Chlamydia trachomatis* [353].

4.1.2.6 Domaine II

Un degré de résistance plus modéré et limité à un certain sous-groupe de macrolides est porté par des mutations autour du nucléotide 752 (structure tige-boucle 35 du domaine II de l'ARN), notamment sur le nucléotide 754 [343, 396].

La mutation U754A confère une résistance de bas niveau à l'érythromycine et la télithromycine chez *E. coli* [343]. La délétion A752 associée à une mutation en position 2058 provoque une résistance croisée aux macrolides en C14 et C15 et à la télithromycine [397]. Ces observations soulignent l'importance du domaine II de l'ARNr 23S dans le mécanisme d'action des kétolides bien que l'étude de Novotny *et al.* montrent des données contradictoires où les mutations dans les domaines II et V de l'ARN ne seraient pas suffisantes pour conférer une résistance significative aux kétolides [396].

Douthwaite *et al.* ont montré que des délétions inférieures à 25 pb dans l'hélice 1198 – 1247 conféraient une résistance à l'érythromycine [398].

4.1.2.7 Protéines L4 et L22

Les premières mutations conférant une résistance à l'érythromycine ont été identifiées dans les protéines ribosomales L4 et L22 d'*E. coli* : substitution de l'acide aminé

Lys63Glu sur la protéine L4 ; délétion de 3 acides aminés, Met82-Lys83-Arg84 sur la protéine L22 [399].

Ces mutations sont associées à un degré de résistance modéré [343, 396]. Elles portent essentiellement sur les boucles protéiques émises vers le tunnel d'élongation du peptide, ce qui va affecter directement les contours du tunnel et l'accessibilité de l'ARNr : acides aminés 62 à 67 pour L4, acides aminés 88 à 93 pour L22. Des mutations en dehors des boucles protéiques sont également décrites, elles modifient la structure tertiaire de la protéine et affectent indirectement les conformations du tunnel et de l'ARNr. Diner *et al.* ont identifié 341 mutations affectant les boucles des protéines L4 et L22 qui convergent vers le tunnel [400]. Plusieurs de ces mutations sont complexes et comportent de multiples mutations faux-sens, délétions dans le cadre de lecture et insertions. Toutes conféraient une résistance croisée aux macrolides à l'exception de la mutation Lys90Trp conférant une résistance à l'érythromycine seulement, la sensibilité aux macrolides à 16 atomes de carbone (tylosine, spiramycine) étant conservée.

Les principales mutations sur les protéines L4 et L22 décrites dans la littérature figurent dans les tableaux 15 et 16.

Chez *E. coli*, il a été montré que les mutations sur L4 modifiaient l'interaction de la protéine L4 avec les nucléotides G799 et U1255 du domaine II de l'ARNr 23S et avec le nucléotide A2572 du domaine V. La mutation sur L22 modifie son interaction avec les nucléotides U747, G748 et A1268 du domaine II, le nucléotide A1614 du domaine III et le nucléotide G2351 du domaine V. Aucun de ces nucléotides n'est à proximité du nucléotide clé A2058. [399]. Bien que les protéines se lient au domaine I de l'ARNr 23S, la résistance induite par les mutations dans les protéines L4 et L22 perturbe les domaines II, III et V de l'ARNr 23S et affecte indirectement le centre peptidyl-transférase.

Les ribosomes contenant une protéine L4 mutée ne peuvent plus lier l'érythromycine en raison d'un rétrécissement de l'entrée du tunnel d'élongation peptidique.

A l'inverse, les ribosomes contenant une protéine L22 mutée établissent toujours une liaison avec l'antibiotique et conservent une activité peptidyl-transférase inaltérée. La structure de la protéine L22 consiste en un domaine unique avec 3 feuillets β et une boucle qui se loge au sein de l'ARNr parallèlement à l'axe du tunnel d'élongation du polypeptide. La délétion des 3 acides aminés chez les mutants induit une modification du positionnement de la boucle qui se place perpendiculairement au tunnel. La distance entre les protéines L4 et L22 est réduite de 12 à 9 angströms ce qui modifie l'interaction entre protéine L22 et domaine II de l'ARNr 23S. L'érythromycine n'interagit plus qu'avec un seul côté du tunnel et ne peut plus bloquer l'élongation du peptide [401-403].

Les rickettsies responsables du typhus sont naturellement sensibles à l'érythromycine tandis que celles responsables des fièvres pourprées sont résistantes. L'étude des séquences de l'ARNr 23S et des protéines L4 et L22 a montré qu'il existe entre ces deux groupes une différence de 3 AA (AA85, 86 et 91) sur une région très conservée de la protéine L22 [404].

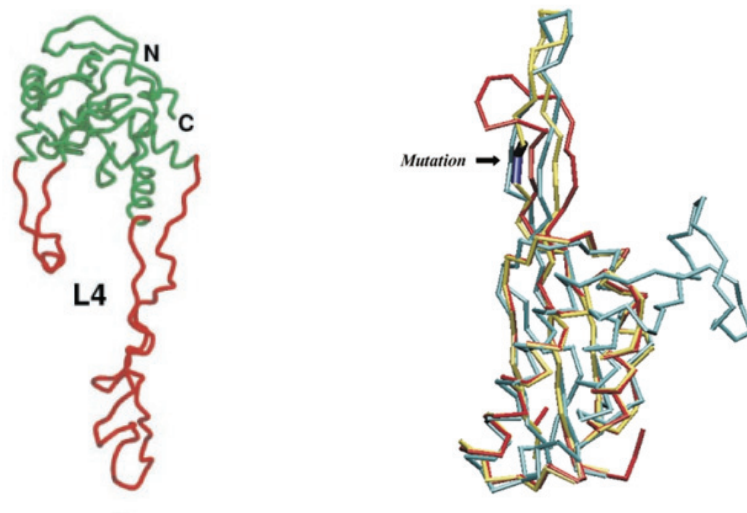


Figure 19. Structure tertiaire des protéines L4 et L22.

(A gauche) Structure de la protéine ribosomale L4 de *Haloarcula marismortui*, d'après Ban *et al.* [299]. Les domaines globulaires sont représentés en vert, les domaines non globulaires en rouge. **(A droite)** Superposition des protéines L22 non mutées de *T. thermophilus* (en jaune) et *D. radiodurans* (en vert), et de la protéine mutée de *Thermus thermophilus* (en rouge), d'après Davydova *et al.* [402].

4.1.2.8 Discordances entre mutations décrites *in vitro* et *in vivo*

Pour une même espèce bactérienne, les mutations observées sur des souches sélectionnées *in vitro* peuvent différer des mutations décrites sur des souches cliniques. Par exemple, pour *Mycoplasma hyorhinis*, davantage de mutations ont été décrites sur des souches sélectionnées *in vitro* [405]. Pour *Campylobacter*, des mutations sur la protéine L4 ont été identifiées uniquement sur des mutants sélectionnés *in vivo* tandis que les mutations sur la protéine L22 n'ont été observées qu'*in vitro* [406].

Les mutations sur un pathogène clinique apparaissent après un échec d'antibiothérapie et les souches sélectionnées sont alors celles qui confèrent le plus haut niveau de résistance. Les mutations créées en laboratoire permettent d'améliorer la compréhension des mécanismes de résistance. Sous des conditions contrôlées au laboratoire, un panel de résistance moins efficace peut être généré qui ne présage pas systématiquement des mécanismes qui seront observés *in vivo*.

Tableau 15. Mutations de la protéine ribosomale L4 responsables de résistance aux macrolides.

Bactérie	Isolement ^a	Mutation ^b	Phénotype ^c	Références
<i>B. henselae</i>	C	G71R +/- H75Y	M14, M15, Tel	Biswas <i>et al.</i> , 2006 [349]
<i>B. quintana</i>	C	Ins ₇₁ GRARHSSAR	Ery	Meghari <i>et al.</i> , 2006 [407]
<i>C. jejuni</i>	L	G74D	Ery	Cagliero <i>et al.</i> , 2006 [408]
		G74D, G57D, G57V	Ery	Caldwell <i>et al.</i> , 2008 [406]
<i>C. trachomatis</i>	L	Q66K	M14, M15, M16 ^{BN}	Binet <i>et al.</i> , 2007 [354]
	L	P109L, P151A + 23S	Ery, Azi, Jos	Zhu <i>et al.</i> , 2010 [409]
<i>E. coli</i>	L	K63E	Ery	Chittum <i>et al.</i> , 1994 [410]
<i>H. influenzae</i>	L	G65D	M14, Cli	Clark <i>et al.</i> , 2002 [355]
		Del ₆₅ GR	Ery, Azi, Q-D	
		G53A, Del ₆₆ RA	M14	
	C	Ins ₆₃ GT	Clr, Azi	Peric <i>et al.</i> , 2003 [356]
		K61Q	Clr, Azi	
		T64K	Clr, Azi	
		T64K + L22	Clr, Azi	
		T64K + L4 + L22	Clr, Azi	
		G65D	Clr, Azi	
		A69S	Clr, Azi	
		T82I	Clr, Azi	
		D94E + L22	Clr, Azi	
		D139G + 23S	Clr, Azi	
<i>M. genitalium</i>	C	H69R + 23S	Ery, Clr, Azi	Jensen <i>et al.</i> , 2008 [367]
<i>M. hominis</i>	L	H184L	M16, S _A -S _B ^{BN}	Pereyre <i>et al.</i> , 2006 [344]
<i>M. pneumoniae</i>	L	Ins ₆₀ G	ML, Tel	Pereyre <i>et al.</i> , 2004 [382]
		Ins ₆₀ GG ou ₆₀ G ₆₀ GGG	ML, S _A -S _B , Tel	
		H70R	M16, Cli	
		H70L + 23S + L22	M, Tel	
<i>S. aureus</i>	C	G69A, T70P, R168S	M14, M16	Prunier <i>et al.</i> , 2005 [411]
<i>S. pneumoniae</i>	L	G69C	M15, M16, S _B	Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000 [337]
		Ins ₆₈ SQ	M15, S _B	
	L	Ins ₆₉ GTGREK	MS _B , Tel	Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000 [337]
	L	G71R + L22	M14, M15, Pri, Tel ^{BN}	Canu <i>et al.</i> , 2002 [341]
	C	⁶⁹ GTG ₇₁ => TPS	MS _B	Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000 [412]
	C	⁶⁹ GTG ₇₁ => TPS	M14, M15	Davies <i>et al.</i> , 2005 [330]
	C	Ins ₆₈ RRQ	M14, M15	Nagai <i>et al.</i> , 2002 [413]
	C	S20N + 23S	MLS _B	Reinert <i>et al.</i> , 2003 [414]
		S20N, A197V + 23S	MLS _B	

Bactérie	Isolement ^a	Mutation ^b	Phénotype ^c	Références
<i>S. pneumoniae</i>	C	R95H	MLS _B	Reinert <i>et al.</i> , 2003 [414]
	C	I78V + 23S	ML	Farrell <i>et al.</i> , 2004 [342]
		G71R + 23S	ML	
		Del ₆₉ GTGR + K68S	ML, Q-D	
		Ins ₆₉ E	ML	
		Del ₆₅ WR	ML	
		₆₉ GT ₇₀ => VP	ML	
		K68Q	ML	
	E30K + ₆₉ GTG ₇₁ =>TPS + V88I	ML		
<i>S. pyogenes</i>	C	Ins ₆₉ KG	M15, M16	Malbruny <i>et al.</i> , 2002 [415]
	C	Del ₆₃ WR	Ery ^{BN} , Azi	Bingen <i>et al.</i> , 2002 [416]
		Del ₆₈ TG	Ery ^{BN} , Azi	
		Ins ₇₂ RA	EryBN, Azi, Jos	
<i>U. parvum</i>	C	Ins ₆₉ TGKAR	Ery, Azi	Xiao <i>et al.</i> , 2011 [373]
	L	T70K	Jos	Pereyre <i>et al.</i> , 2007 [339]
		G71V	MLS _K ^{BN}	

^a C, souche clinique ; L, souche sélectionnée en laboratoire

^b positions correspondant à celles de l'espèce ; + L22, +23S, mutation additionnelle dans la protéine ribosomale L22 ou l'ARNr 23S

^c phénotype de résistance mentionné dans la publication

M, macrolides ; M14, M15, M16, macrolides à 14, 15 ou 16 atomes de carbone ; L, lincosamides ; S_A, streptogramines A ; S_B, streptogramines B ; Ery, érythromycine ; Azi, azithromycine, Clr, clarithromycine ; Tel, télithromycine ; Jos, josamycine ; Spi, spiramycine ; Cli, clindamycine ; Q-D, quinupristine-dalfopristine

^{BN}, bas niveau de résistance ; ^{HN}, haut niveau de résistance

Del, délétion ; Ins, insertion.

Tableau 16. Mutations de la protéine ribosomale L22 responsables de résistance aux macrolides.

Bactérie	Isolement ^a	Mutation ^b	Phénotype ^c	Références
<i>C. jejuni</i>	C	Ins ₇₃ GAVLT ₇₄	Ery	Lehtopelku <i>et al.</i> , 2011 [376]
	L	Ins ₈₆ ARAR ₈₇	Ery	Cagliero <i>et al.</i> , 2006 [408]
		Ins ₉₈ TSH ₉₉	Ery	
	C	Ins ₉₈ TSH ₉₉	Ery	Caldwell <i>et al.</i> , 2008 [406]
<i>E. coli</i>	L	Del ₈₂ MKR	Ery	Chittum <i>et al.</i> , 1994 [410]
<i>F. tularensis</i>	L	G91D	Ery	Gestin <i>et al.</i> , 2010 [338]
		Del ₈₂ MKR	Ery	
<i>H. influenzae</i>	L	R88P	M14, M15, Q-D	Clark <i>et al.</i> , 2002 [355]
		A94E	M14, M15, Q-D	
		Del ₈₂ M	M14, M15, Cli	
		Del ₈₂ MKR	M14, M15	
		Ins ₇₂ KIFVEVA	M14, M15	
	C	G91D	Clr, Azi	Peric <i>et al.</i> , 2003 [356]
		Del ₈₁ S	Clr, Azi	
		Del ₈₂ M	Clr, Azi	
		Del ₉₅ RI	Clr, Azi, Tel	
		Del ₉₆ ILK	Clr, Azi	
		Del ₉₆ ILKR + L4	Clr, Azi	
		Dup ₇₇ DEGPSM	Clr, Azi	
		Dup ₈₈ RAKG	Clr, Azi	
		Ins ₉₁ KG	Clr, Azi	
		Ins ₉₁ RAG	Clr, Azi	
		Ins ₉₁ RADR	Clr, Azi	
		G91D + L4	Clr, Az	
		G91D + L4 + 23S	Clr, Az	
		Del ₉₅ RI + 23S	Clr, Az	
<i>M. genitalium</i>	C	E123K + 23S	Ery, Clr, Azi	Jensen <i>et al.</i> , 2008 [367]
<i>M. hominis</i>	L	R97K	M16, L	Pereyre <i>et al.</i> , 2006 [344]
<i>M. pneumoniae</i>	C	A114T + 23S	M14, M15, Tel	Pereyre <i>et al.</i> , 2004 [382]
		A114T + P112R + 23S + L4	M, Tel	
		A114T + 23S + L4	M, Tel	
		Del ₁₁₁ IPRA	M, Tel	

Bactérie	Isolement ^a	Mutation ^b	Phénotype ^c	Références
<i>S. aureus</i>	L	Del79GP	Ery, S _A -S _B , Tel	Malbruny <i>et al.</i> , 2002 [417]
		Dup ₈₄ GPTLK	Ery, S _A -S _B , Tel	
		Del ₉₈ KR, Dup ₁₀₁ SAINKTR	Ery, S _A -S _B , Tel	
		Del ₉₉ R, Ins ₁₀₁ IHITI	Ery, S _A -S _B , Tel	
		Dup ₁₀₁ SAINKTR	Ery, S _A -S _B , Tel	
	C	Dup ₁₀₁ SAINKTR	Ery, S _A -S _B , Tel	Malbruny <i>et al.</i> , 2002 [417]
<i>S. mitis</i>	C	A105G, T108A	ML, S _A -S _B	Achour <i>et al.</i> , 2004 [418]
<i>S. pneumoniae</i>	L	G83E, P91S, A93E	M14, M15, Pri, Tel ^{BN}	Canu <i>et al.</i> , 2002 [341]
		A93E + 23S	M14, M15, Pri, Tel ^{BN}	
		G95D	M14, M15, Pri, Tel ^{BN}	
		G95D + L4	M14, M15, Pri, Tel ^{BN}	
		P99Q	M14, M15, Pri, Tel ^{BN}	
	C	Dup ₁₀₃ RTAHIT	Ery, Azi, Q-D	Musher <i>et al.</i> [419]
	C	G95D + 23S	M, Q-D	Farrell <i>et al.</i> , 2003 [371]
C	C117T + L4	M14, M15, M16	Reinert <i>et al.</i> , 2003 [414]	
<i>U. parvum</i>	L	K91N	MK	Pereyre <i>et al.</i> , 2007 [339]

^a C, souche clinique ; L, souche sélectionnée en laboratoire

^b positions correspondant à celles de l'espèce ; + L4, +23S, mutation additionnelle dans la protéine ribosomale L4 ou l'ARNr 23S

^c phénotype de résistance mentionné dans la publication

M, macrolides ; M14, M15, M16, macrolides à 14, 15 ou 16 atomes de carbone ; L, lincosamides ; S_A, streptogramines A ; S_B, streptogramines B ; Ery, érythromycine ; Azi, azithromycine, Clr, clarithromycine ; Tel, télichromycine ; Jos, josamycine ; Spi, spiramycine ; Cli, clindamycine ; Q-D, quinupristine-dalfopristine

^{BN}, bas niveau de résistance ; ^{HN}, haut niveau de résistance

Del, délétion ; Ins, insertion.

4.2 Efflux de l'antibiotique

Les bactéries ont toutes de multiples pompes d'efflux qui importent et exportent de nombreux composants : antibiotiques, colorants, détergents, désinfectants, facteurs de virulence, hormones, sels biliaires... L'antibiotique est pompé en dehors de la cellule ou de la membrane cellulaire. Des concentrations intracellulaires d'antibiotiques basses sont ainsi maintenues et les ribosomes restent fonctionnels [420-422].

Il existe cinq familles de pompes à efflux qui sont associées à la résistance aux antibiotiques [422]:

- la superfamille *ATP-binding cassette* (ABC) ;
- la superfamille *major facilitator* (MFS) ;
- la famille *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) ;
- la famille *small multidrug resistance* (SMR) ;
- la famille *resistance nodulation division* (RND).

Les pompes à efflux sont classées dans ces familles sur la base du nombre de composants de la pompe (unique ou multiple), du nombre de domaines transmembranaires, de la source d'énergie (ATP, force proton motrice, Na^+/H^+) et du type de substrat que la pompe exporte (Figure 20).

La résistance aux macrolides par efflux est médiée par trois familles de pompes à efflux :

- les pompes ABC : gènes *msr(A)* chez *Streptococcus* et *Staphylococcus*, gènes *tlr(C)* et *srm(B)* chez *Streptomyces* [316], gène *msr(E)* chez *Pasteurella* [318] ;
- les pompes MFS : gènes *mef(A)* (pour *macrolide efflux*) chez *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *mef(E)* chez *Streptococcus pneumoniae* et *E. coli*, *mef(I)* chez *S. pyogenes* [319, 321, 423-425] ;
- les pompes RND : gène *cmeABC* chez *Campylobacter* spp [426, 427], *hefA* chez *Helicobacter pylori* [428], gène *mtrCDE* chez *Neisseria gonorrhoeae* [385].

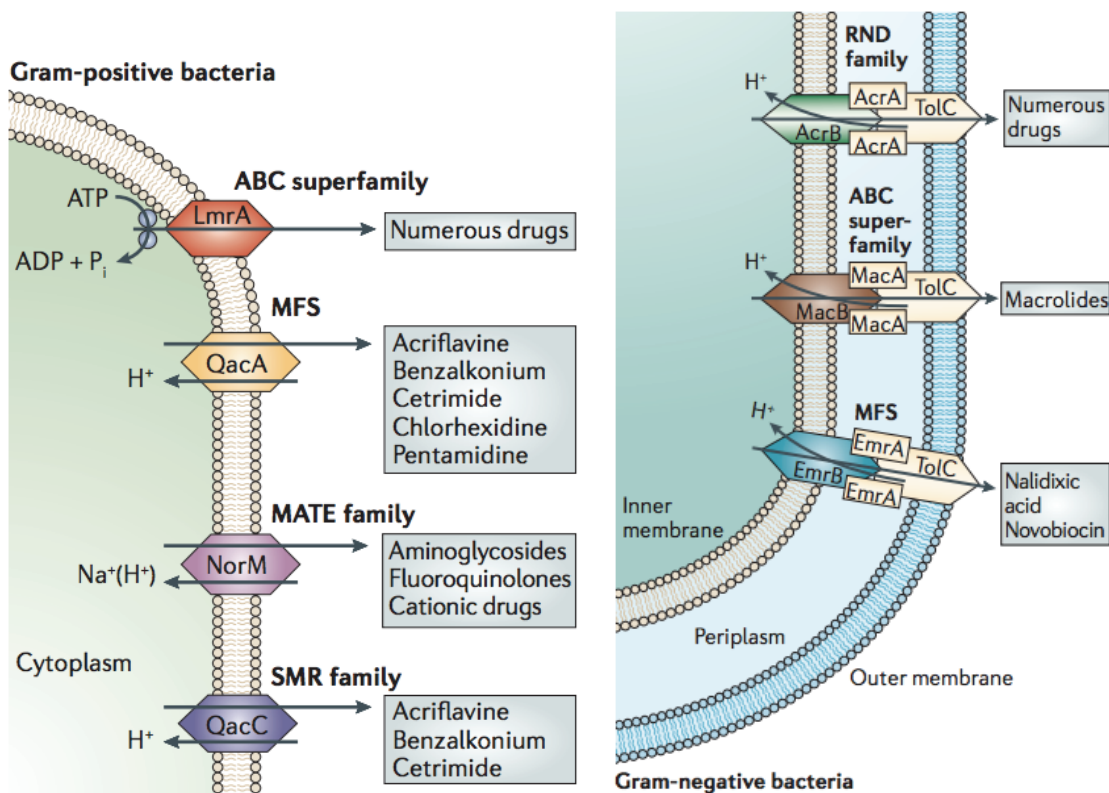


Figure 20. Les cinq familles de pompes à efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques, d'après Piddock [422].

Les gènes codant ces pompes à efflux sont situés sur des éléments génétiques transmissibles comme des plasmides ou des transposons (exemple : gène *mef*) ou sur le chromosome bactérien (exemple : gène *cmeABC*). Dans ce dernier cas, la résistance peut résulter de l'augmentation de l'expression d'une pompe à efflux constitutive par différents mécanismes : mutation dans le promoteur du gène, mutation dans le répresseur du gène, mutation dans un régulateur global (activation de la transcription). Chez *N. gonorrhoeae*, la protéine MtrR, un régulateur global de la transcription, réprime la transcription de la pompe à efflux MtrCDE [380, 385, 429]. Lorsqu'elle est mutée, la transcription de la pompe à efflux est déréprimée ce qui induit une résistance aux macrolides.

Les mécanismes de résistance par efflux peuvent être responsables de résistances croisées entre différentes classes d'antibiotiques, la pompe pouvant effluer plusieurs composés de nature différente. Par exemple, la pompe CmeABC présente chez *Campylobacter jejuni* efflue à la fois les macrolides et les tétracyclines [430].

Les mécanismes de résistance par efflux sont associés à un niveau de résistance modéré. Les CMI obtenues pour les mutants résistants par efflux sont généralement multipliées par 2

à 8 par rapport aux souches sauvages tandis qu'un haut niveau de résistance est associé à l'expression d'enzymes ou à des mutations sur les gènes codant l'ARNr 23S.

4.3 Inactivation enzymatique

La résistance par inactivation est rare en comparaison aux mécanismes de modification de la cible ou d'efflux. Elle est principalement retrouvée chez des bactéries à Gram négatif. Son support est plasmidique [316].

Deux mécanismes d'inactivation enzymatique des macrolides ont été décrits :

- gènes codant des estérases qui clivent le cycle lactone : gènes *ere(A)* et *ere(B)* (*erythromycin esterase*) conférant une résistance aux macrolides en C14 et C15 [431] ;
- gènes codant des phosphorylases ou phosphotransférases : gènes *mph(A)* (*macrolide phosphotransferase*) conférant une résistance à tous les macrolides, gènes *mph(B)* et *mph(C)* conférant une résistance aux macrolides en C14 et C16 [315, 431] ; chez *Pasteurella multocida*, le gène *mph(E)* s'organise en tandem avec le gène d'efflux *msr(E)* chromosomique et est sous la dépendance du même promoteur [318].

4.4 Additivité des mécanismes

Les mécanismes de résistance aux macrolides précédemment décrits peuvent s'additionner chez un même pathogène :

- mutations dans les gènes codant les protéines ribosomales et l'ARNr 23S décrites chez de très nombreuses bactéries ; chez *M. pneumoniae*, l'association de mutations sur les gènes *rplD* et *rplV* (protéines L4 et L22) à une mutation sur le nucléotide 2611 (ARNr 23S) permettent d'acquérir un haut niveau de résistance aux macrolides [382] ;
- efflux, modification des protéines ribosomales et de l'ARNr 23S pour *Haemophilus influenzae* [356, 432] ;
- efflux et phosphotransférases chez *Pasteurella* [318] ;
- efflux et méthylase (*ermB*) chez *Lactobacillus* spp [359] ;
- efflux (pompe CmeABC) et modification de l'ARNr 23S responsables d'un haut niveau de résistance pour *Campylobacter* [430, 433] ;
- efflux (pompe CmeABC) et modification des protéines ribosomales L4/L22 pour *Campylobacter jejuni* [406, 408] ...

5 Annexes

Annexe 1. Composition du milieu de culture BCYE

Extrait de levure	10 g
Charbon activé	2 g
Agar	17 g
Tampon ACES	10 g

Stériliser le milieu par autoclavage à 121°C, 20 minutes.

L-cystéine	0,4 g
Pyrophosphate de fer	0,25 g
Eau distillée	qsp 1000 mL

Ajustement du pH à 6,9 par KOH 1 N.

Annexe 2. Composition du milieu PYG utilisé pour l'entretien des amibes

Protéose peptone	15 g
Extrait de levure	5 g
D-glucose	10 g
FeSO ₄	3 mg
Milieu PAS	qsp 1 L

Stériliser le milieu par autoclavage à 121°C, 20 minutes.

Annexe 3. Composition du milieu PAS utilisé pour la co-culture amibienne

Solution A

NaCl	1,20 g
MgSO ₄	0,04 g
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
KH ₂ PO ₄	1,36 g
Qsp 100 mL d'eau distillée	

Solution B

CaCl ₂	0,04 g
Qsp 100 mL d'eau distillée	

PAS : 10 mL de solution A + 10 mL de solution B + 980 mL d'eau distillée

Ajuster le pH à 6,60 ± 0,10 avec KOH 1 N.

Stériliser le milieu par autoclavage à 11°C, 20 minutes.

Annexe 4. Composition du milieu BYE utilisé pour la réalisation d'antibiogramme par microdilution

Extrait de levure	12 g
Acide α -cétoglutarique	1 g
L-cystéine	0,5 g
Pyrophosphate de fer	0,3 g
ACES	10 g

Qsp 1 L d'eau distillée.

Ajuster le pH à 6,9 et filtrer à 0,22 μ m (filtration stérilisante).

Le milieu BYE ne doit pas être autoclavé (dégradation de la L-cystéine).

1 Introduction

Dans la première partie bibliographique, nous avons présenté les connaissances actuelles sur les méthodes diagnostiques et l'antibiothérapie des légionelloses. Bien que la bibliographie soit abondante, les données portant sur la résistance de *Legionella* aux macrolides font défaut.

Notre objectif principal était d'identifier les mécanismes bactériens pouvant potentiellement contribuer aux échecs thérapeutiques des légionelloses, en particulier lorsqu'elles sont traitées par des macrolides. Néanmoins, la survenue d'échecs thérapeutiques est multifactorielle et fait intervenir des facteurs à la fois liés à l'hôte et au pathogène. Nous commencerons par la description d'un cas clinique d'échec thérapeutique qui illustre une démarche diagnostique dans laquelle les facteurs liés à l'hôte et la bactérie ont été explorés.

Les souches cliniques de *Legionella* étant difficilement isolées à partir de prélèvements respiratoires, notre premier objectif a été d'améliorer le rendement des méthodes d'isolement par culture et par co-culture amibienne. L'isolement d'un nombre croissant de souches nous permettra de mieux définir la sensibilité de la population des souches de légionelles (en ne se concentrant pas uniquement sur les cas graves pour lesquels l'isolement des souches est facilité [99]) et de dépister les éventuelles résistances par la réalisation d'antibiogrammes.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes bactériens susceptibles de contribuer à ces échecs thérapeutiques. Les études cliniques, à l'exception de l'étude récente de Rello *et al.* [279] ne montrant pas de supériorité des bithérapies sur les monothérapies, notre première hypothèse a été qu'un antagonisme entre antibiotiques pouvait favoriser les échecs thérapeutiques. A l'aide d'un modèle intracellulaire, nous avons donc étudié les associations d'antibiotiques sur *L. pneumophila*. Nous avons ensuite sélectionné des souches de *L. pneumophila* hautement résistantes aux macrolides en laboratoire de confinement L3 et nous avons caractérisé la nature et la chronologie des mécanismes moléculaires mis en jeu dans la résistance.

2 Apport de la PCR quantitative en temps réel dans la détection et le suivi des patients en échec thérapeutique

Publication n°1 :

Legionellosis and lung abscesses: contribution of Legionella quantitative real-time PCR to an adapted followup.

G. Descours, C. Tellini, C. Flamens, F. Philit, M. Celard, J. Etienne, G. Lina, S. Jarraud
Case Reports in Infectious Diseases. 2013;190183.

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'intervenir dans ces échecs thérapeutiques, dont des facteurs liés à l'hôte. En effet, l'immunodépression (hémopathie, cancer, corticothérapie, anti-TNF...), la présence de co-morbidités, de complications pulmonaires et/ou extra-pulmonaires sont autant de facteurs de gravité des légionelloses. Il existerait également une susceptibilité d'hôte liée au polymorphisme de récepteurs impliqués dans l'immunité innée, les TLR [103-106]. Le retard à l'initiation d'une antibiothérapie anti-*Legionella* constitue également un facteur de risque démontré [95]. Par ailleurs, la virulence de la souche liée en partie à l'épitope réagissant avec les anticorps monoclonaux 3/1 (MAb 3/1) interviendrait également [142]. En effet, les isolats cliniques sont majoritairement des souches MAb 3/1 positives tandis que les souches environnementales sont majoritairement MAb 3/1 négatives [155].

Ici, nous rapportons un cas de légionellose chez un homme de 28 ans, sans antécédent particulier, dont l'évolution clinique a été rapidement défavorable avec une défaillance cardio-respiratoire précoce nécessitant la mise en place d'une oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) 5 jours après le début des symptômes. Ce patient ne présentait aucun facteur de risque pour une légionellose en dehors d'un tabagisme actif. Sur le plan microbiologique, l'évolution de la légionellose a été marquée par la persistance de cultures positives pour *Legionella* (de plus de 500 à 1 colonie(s)) sur les LBA successifs durant cinq semaines malgré une antibiothérapie adaptée. Les antibiogrammes réalisés sur les souches cliniques isolées successivement n'ont pas montré d'acquisition de résistance au décours de l'antibiothérapie. Les PCR réalisées sur ces mêmes LBA montraient néanmoins des Ct stationnaires, témoignant d'une quantification bactérienne stable dans le temps et suggérant la constitution un foyer infectieux secondaire. Un abcès pulmonaire a été mis en évidence par un scanner thoracique 34 jours après l'admission du patient. Seule la chirurgie de résection de cet abcès a permis une évolution clinique rapidement favorable avec une négativation immédiate des cultures de LBA. La culture de l'abcès était négative

pour *Legionella* tandis que la PCR spécifique montrait une quantification bactérienne très élevée et confirmait le diagnostic d'abcès à *Legionella*.

Plusieurs cas d'abcès pulmonaires à *Legionella*, principalement à *L. pneumophila* séro groupe non 1 ou à *Legionella non pneumophila*, ont été décrits comme associés à des échecs thérapeutiques chez des patients immunodéprimés [91, 92, 434, 435]. L'originalité du cas que nous décrivons réside dans la sévérité de la légionellose chez un patient immunocompétent. En effet, l'exploration de l'immunité du patient (statut VIH, dosages du complément et des Ig, étude des populations lymphocytaires à distance de l'épisode infectieux) n'a montré aucune anomalie particulière.

La PCR constitue un critère de définition des cas probables de légionellose depuis 2011. Ce nouvel outil diagnostique est pour l'instant peu employé en France. Le test de 1^{ère} ligne reste la détection des antigènes urinaires qui permet un diagnostic plus rapide, réalisable par tout laboratoire, 24h/24 et sur un échantillon de recueil facile. Pour les cas initialement diagnostiqués par la détection des antigènes urinaires, la PCR sur prélèvement respiratoire demeure moins sensible [179]. Néanmoins, elle est plus sensible pour l'ensemble des légionelloses incluant *L. pneumophila* séro groupe 1 MAb 3/1 négatives, *L. pneumophila* séro groupe non 1 et *Legionella non pneumophila*. En 2010, Maurin *et al.* ont démontré que la PCR quantitative en temps réel sur un prélèvement respiratoire réalisé à l'admission permettait d'évaluer la sévérité des légionelloses [181]. Le cas que nous décrivons illustre l'apport de la PCR dans le suivi des patients en échec thérapeutique et dans la détection des complications pulmonaires.

La corrélation entre l'évolution clinique des patients présentant une pathologie infectieuse et la quantification des pathogènes est établie pour de nombreuses pathogènes viraux : VIH, hépatites B et C, CMV... De façon identique, la PCR quantitative *Legionella* en temps réel pourrait constituer un marqueur diagnostique et pronostique des légionelloses sévères et permettre une identification précoce des patients en échec thérapeutique.

Case Report

Legionellosis and Lung Abscesses: Contribution of *Legionella* Quantitative Real-Time PCR to an Adapted Followup

**G. Descours,^{1,2,3,4,5,6} C. Tellini,⁷ C. Flamens,⁸ F. Philit,⁹ M. Celard,⁶
J. Etienne,^{1,2,3,4,5,6} G. Lina,^{1,2,3,4,5,6} and S. Jarraud^{1,2,3,4,5,6}**

¹ CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France

² Inserm, U1111, Lyon, France

³ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

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

⁵ CNRS, UMR5308, Lyon, France

⁶ Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Legionella National Reference Center, East Biology & Pathology Center, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron, France

⁷ Centre Hospitalier Pierre Oudot, Biology Laboratory, 30 Avenue du Medipole, 38317 Bourgoin-Jallieu, France

⁸ Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Department of Anesthesiology and Intensive Care, Louis Pradel Hospital, 28 Avenue Doyen Lépine, 69677 Bron, France

⁹ Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Department of Respiratory Medicine, Louis Pradel Hospital, 28 Avenue Doyen Lépine, 69677 Bron, France

Correspondence should be addressed to G. Descours; ghislaine.descours@univ-lyon1.fr

Received 18 March 2013; Accepted 19 May 2013

Academic Editors: S. Dogra and L. Yamuah

Copyright © 2013 G. Descours et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We report a case of severe Legionnaires' disease (LD) complicated by a lung abscess in an immunocompetent patient who required ECMO therapy and thoracic surgery. The results of repeated *Legionella* quantitative real-time PCR performed on both sera and respiratory samples correlated with the LD severity and the poor clinical outcome. Moreover, the PCR allowed for the detection of *Legionella* DNA in the lung abscess specimen, which was negative when cultured for *Legionella*. This case report provides a logical basis for further investigations to examine whether the *Legionella* quantitative PCR could improve the assessment of LD severity and constitute a prognostic marker.

1. Introduction

The detection of *Legionella* DNA by PCR is a criterion for the diagnosis of Legionnaires' disease (LD), but the contribution of repeated *Legionella* quantitative real-time PCR after diagnosis has not been evaluated so far. Here, we described a case of severe LD in an immunocompetent patient monitored by *Legionella* quantitative PCR under antimicrobial therapy. The persistence of stationary PCR cycle thresholds allowed for the detection of a lung abscess.

2. Case Presentation

A 28-year-old male smoker without previous illness presented to the emergency department with sudden left thoracic pain and dyspnoea. On examination, the patient's temperature was 37.6°C, heart rate was 90 beats/min, blood pressure was 110/60 mm Hg, and oxygen saturation was 93% on room air. The chest examination revealed crackles to the left upper lobe. The remainder of the examination was normal, and the patient was admitted to the short stay unit. Initial laboratory investigations revealed the following values:

TABLE 1: Microbiological results for *Legionella* during the patient's hospitalisation.

	Day after admission (D)																	
	D4	D5	D6	D11	D14	D17	D22	D24	D26	D29	D34	D39	D42 Surgery	D43	D54	D72	D380	
<i>Legionella</i> urine antigen test		+																+
Axenic culture (number of colonies on an agar plate)																		
BAL specimen*	+	+	+				+	+	+	+	+	+		-	-	-	-	
	(>500)	(>500)	(>500)				(26)	(5)	(10)	(1)	(8)	(3)	(1)					
Lung abscess specimen														-	-			
<i>L. pneumophila</i> PCR Ct																		
BAL specimen		18.9	20.0				21.3	26.1	23.1	25.0	24.3	25.0	25.3	22.7	27.4	34.1	>45	
Lung abscess specimen														17.3	16.0			
Serum specimen				33.2	30.9	32.7		36.1		>45								

BAL, bronchoalveolar lavage; Ct, cycle threshold; +, positive; and -, negative.
*except on D4: sputum specimen.

leucocyte count, 13,900 cells/mm³; 85% polymorphonuclear neutrophils; sodium, 136 mmol/L; potassium, 3.9 mmol/L; CRP, 36 mg/L; D-dimer under a positivity threshold; and normal cardiac, renal, and liver function tests. A chest X-ray and a thoracic computed tomography scan revealed a large left lower lobe compression. *Streptococcus pneumoniae* community-acquired pneumonia (CAP) was suspected, and the patient started receiving oral amoxicillin therapy according to the current recommendations [1].

On hospital day 3 and under increasing thoracic pain, the patient was transferred to the pneumology unit, where he rapidly deteriorated with a progressive cough that produced whitish sputum, left pleural pain requiring morphine administration, and a temperature spike to 40.5°C. On hospital day 4, his vital signs revealed a heart rate of 123 beats/min, a blood pressure of 118/69 mm Hg, a respiratory rate of 38 breaths/min, and an oxygen saturation of 89% on 10 L oxygen supply. The leucocyte count was 2.8 cells/mm³, CRP was 323 mg/L, natremia was 130 mmol/L, and phosphatemia was 0.64 mmol/L. Sputum was collected for microbiological investigations. Although a *Legionella* urinary antigen test was prescribed, no urine was ever collected. The antibiotic therapy was enlarged to intravenous amoxicillin/clavulanic acid and spiramycin, and the patient was transferred to the intensive care unit (ICU), where he rapidly deteriorated and required intubation. On day 5, the sputum indicated no respiratory pathogens after 24 hours of culturing on standard media. Analysis of the arterial blood gas indicated severe acute respiratory failure with a pH of 7.20, a CO₂ pressure of 55.7 mm Hg, and an O₂ pressure of 75.9 mm Hg on an FiO₂ fraction of inspired oxygen, of 100%. The CRP was 446 mg/L, and the leucocyte count decreased to 0.8 cells/mm³. In spite of the antimicrobial therapy, which was switched to ceftriaxone, rovamycin, and levofloxacin, his temperature remained 39.5°C. He was then transferred to the cardiology ICU.

A few hours later, a laboratory examination revealed cardiac failure with a troponin of 0.19 µg/L (normal range,

<0.1 µg/L). An ultrasonic cardiograph indicated that the left ventricular ejection fraction decreased to 30%. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation (VAECMO) therapy was initiated. The *Legionella* urine antigen (BinaxNOW *Legionella*, Alere SAS, Jouy-en-Josas, France) test was positive, and the antibiotic regimen was switched to erythromycin and levofloxacin. Using a serum specimen, the *Legionella* real-time PCR (PCR *L. pneumophila*, Diagenode, Evry, France) was also positive (Table 1).

On day 7, his leucocyte count was 14 cells/mm³. Bronchoalveolar lavages (BAL) and sputa cultures performed on day 4 grew *L. pneumophila* serogroup 1 (Lp1), which was typed as monoclonal antibody (mAb) 3/1-negative (Bellingham subtype) and sequence type (ST) 48 (Table 1) [2]. On day 13, a thoracic computed tomography scan likely evoked a lung abscess or necrosis on the left upper lobe, and rifampicin was added to the antibiotic regimen.

The patient's pulmonary functions progressively improved, and the VAECMO was discontinued 22 days later. However, the patient was still presenting temperature spikes. The chest X-ray and thoracic computed tomography scan demonstrated no improvement, and repeated BAL cultures indicated a persistent *Legionella pneumophila* infection (Table 1). The minimal extracellular concentrations inhibiting intracellular growth (MIEC) for erythromycin, levofloxacin, and rifampicin were determined on *Legionella* strains isolated from successive BAL, but no antibiotic resistance was observed (MIEC: erythromycin, 0.125 mg/L; levofloxacin, 0.016 mg/L; and rifampicin, 0.001 mg/L) [3]. In addition, the real-time PCR performed on the BAL demonstrated stationary cycle thresholds (Ct), reflecting stationary *Legionella* DNA amounts (Table 1).

On day 34, a thoracic CT scan revealed a voluminous lung abscess on the left pulmonary upper lobe (Figure 1). An anaerobic BAL culture isolated *Fusobacterium nucleatum*, and nitroimidazole was added to the antibiotic regimen. The abscess was resected one week later (day 42) and revealed many leucocytes, and a culture was positive for *F. nucleatum*. Although the abscess culture was negative for *L. pneumophila*,

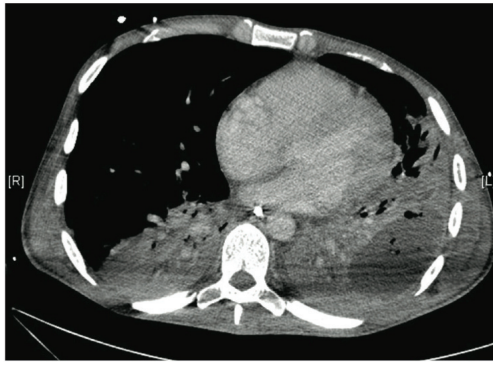


FIGURE 1: Thoracic CT scan revealing a voluminous lung abscess on the left pulmonary upper lobe on hospital day 35.

the *Legionella* real-time PCR was positive (Table 1). The surgery allowed for a rapid clinical improvement. The fever resolved within 6 days, and mechanical ventilation was successfully discontinued 20 days after the surgery (day 62). The patient was discharged to the pneumology unit, where he completed a 7-week course of levofloxacin and nitroimidazole therapy. The CT scan indicated a complete resolution of the lung abscess, and the patient recovered completely. Water samples from the patients' home were investigated, but the source of the infection was not determined. The *Legionella* urinary antigen still tested positive one year later, which has been described in patients with a long-term defervescence of fever (Table 1) [4]. The patient remained well at the time of the follow-up examination at 2 years.

3. Discussion

In this paper, we have described a case of severe Legionnaires' disease (LD), complicated by a lung abscess in an immunocompetent patient who required ECMO therapy and thoracic surgery. Few cases of acute respiratory failure due to *Legionella* and requiring ECMO therapy have been reported [5–7]. In such patients, Ichiba et al. described a survival rate limited from 25% to 53.8% [6]. The severity of this reported case might be attributed to a delayed diagnosis, and thus a delayed initiation of the antibiotic treatment, although guidelines for the management of CAP were followed [1, 8]. In this case, spiramycin was added on hospitalisation day 4 when the patient deteriorated. A specific anti-*Legionella* therapy combining a macrolide and fluoroquinolone was initiated on day 5 when the *Legionella* antigenuria test was positive. The severe leucopenia that developed during the first five days may also have contributed to the severity of the infection. Leucopenia has rarely been described during LD and has never been associated with a severe infection [9, 10]. However, the fundamental role of neutrophils in the clearance of *Legionella* from the lungs has been demonstrated with mouse studies [11]. The isolation of a mAb 3/1-negative *L. pneumophila* strain is unusual in an immunocompetent and nonhospitalised patient because the lipopolysaccharide reactivity pattern of mAb 3/1 mediates the virulence of *L. pneumophila* [2, 12]. MAb 3/1-negative strains have a high

incidence among hospitalised and immunocompromised patients, whereas immunocompetent patients are mainly infected by mAb 3/1-positive strains. The isolation of a mAb 3/1-negative strain from this patient warranted an investigation of his cellular immunity, which was, however, unaffected.

The microbiological results revealed a gradual decrease in the *Legionella* quantitative culture from the BAL according to the time (from day 4 to day 39, Table 1). Conversely, the real-time PCR Ct, which was inversely proportional to the amount of *Legionella* DNA present in the BAL sample as well as in the serum samples, increased over time (from day 5 to day 72 and from day 6 to day 26, resp.). These results demonstrate that repeated quantitative *Legionella* PCR from BAL and serum samples allows for a much more rapid and accurate surveillance of severe LD patients in comparison to conventional culturing methods. Moreover, the real-time PCR allowed for the detection of high *Legionella* DNA load in the lung abscess specimen, which was negative when cultured for *Legionella*. The persistence of viable but nonculturable (VBNC) *Legionella* in the lung abscess was considered, thus, the antibiotic treatment was not discontinued. The true incidence of *L. pneumophila* lung abscesses might be higher than suggested by culture investigations due to the difficulty involved in isolating the organism.

The *Legionella* quantitative real-time PCR results correlated with the poor clinical outcome of the patient. *Legionella* DNA can be detected in serum within the first two weeks after the onset of symptoms [13–15]. Nevertheless, positive results on the first available serum sample are related to the severity of the LD at the time of diagnosis, and persisting positive results over two weeks are reported in less than 5% of patients [15–17]. In parallel, a high DNA load from the BAL at the time of admission also correlates with the severity of the LD, the need for hospitalisation in an ICU, and the duration of the hospitalisation [18]. Moreover, PCR on respiratory samples usually reaches its detection limit within the first week of the antimicrobial therapy, which was not observed with this patient [19]. As described by Diederer et al. on sera, our results illustrate that quantitative *Legionella* PCR on both sera and respiratory samples may allow for the assessment of the LD severity and may be a valuable tool to monitor the effects of antimicrobial therapies [20].

The infection was not resolved by antibiotic therapy and required surgery, likely because the therapeutic antibiotic levels did not reach within the abscess. Only a few cases of lung abscesses complicating LD have been described in immunocompromised patients [21–23]. The persistence of positive *Legionella* cultures and stationary PCR Ct may systematically investigate the presence of abscesses that have been described as factors associated with *Legionella*-related mortality [24, 25].

In summary, the conventional culturing of respiratory samples is essential for the isolation of *Legionella* strains and allows for epidemiological investigations. Nevertheless, repeated *Legionella* quantitative real-time PCR on serum and respiratory samples appears to be highly beneficial for the evaluation of LD severity and its prognosis and for monitoring severely ill patients under antimicrobial therapy. In this paper, the persistence of stationary PCR Ct correlated

with poor clinical outcome and allowed for the detection of a lung abscess in an immunocompetent patient. This provides a logical basis for further investigations to examine whether the *Legionella* quantitative PCR could improve the assessment of LD severity and constitute a prognostic marker.

References

- [1] M. Woodhead, F. Blasi, S. Ewig et al., "Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections—summary," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, supplement 6, pp. 1–24, 2011.
- [2] J. H. Helbig, J. B. Kurtz, M. C. Pastoris, C. Pelaz, and P. C. Lück, "Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, no. 11, pp. 2841–2845, 1997.
- [3] G. Descours, C. Ginevra, F. Ader et al., "Rifampicin-macrolide synergy against *Legionella pneumophila* serogroup 1 in human macrophages using a quantitative real-time PCR assay," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 38, no. 2, pp. 188–189, 2011.
- [4] N. Sopena, M. Sabrià, M. L. Pedro-Botet et al., "Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 21, no. 12, pp. 845–848, 2002.
- [5] D. J. Harris, G. J. Duke, and J. McMillan, "Extracorporeal membrane oxygenation for Legionnaires disease: a case report," *Critical Care and Resuscitation*, vol. 4, pp. 28–30, 2002.
- [6] S. Ichiba, D. R. Jenkins, G. J. Peek et al., "Severe acute respiratory failure due to *Legionella* pneumonia treated with extracorporeal membrane oxygenation," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 28, no. 3, pp. 686–687, 1999.
- [7] E. Muller, M. Knoch, W. Holtermann, and H. Lennartz, "Adult respiratory distress syndrome in *Legionella* pneumonia—successful treatment with extracorporeal CO₂ elimination procedures," *Anästhesie, Intensivtherapie, Notfallmedizin*, vol. 24, no. 3, pp. 177–180, 1989.
- [8] C. H. Heath, D. I. Grove, and D. F. M. Looke, "Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 15, no. 4, pp. 286–290, 1996.
- [9] R. Bellmann-Weiler, M. Ausserwinkler, K. Kurz, I. Theurl, and G. Weiss, "Clinical potential of C-reactive protein and procalcitonin serum concentrations to guide differential diagnosis and clinical management of pneumococcal and *Legionella* pneumonia," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, no. 5, pp. 1915–1917, 2010.
- [10] C. Chidiac, D. Che, S. Pires-Cronenberger et al., "Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France," *European Respiratory Journal*, vol. 39, no. 4, pp. 963–970, 2012.
- [11] K. Tateda, T. A. Moore, J. C. Deng et al., "Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia," *Journal of Immunology*, vol. 166, no. 5, pp. 3355–3361, 2001.
- [12] J. H. Helbig, P. C. Luck, Y. A. Knirel, W. Witzleb, and U. Zahringer, "Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1," *Epidemiology and Infection*, vol. 115, no. 1, pp. 71–78, 1995.
- [13] P. Matsiota-Bernard, S. Waser, and G. Vrioni, "Detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 6, no. 4, pp. 223–225, 2000.
- [14] D. R. Murdoch and S. T. Chambers, "Detection of *Legionella* DNA in peripheral leukocytes, serum, and urine from a patient with pneumonia caused by *Legionella dumoffii*," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 30, no. 2, pp. 382–383, 2000.
- [15] D. R. Murdoch, E. J. Walford, L. C. Jennings et al., "Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 23, no. 3, pp. 475–480, 1996.
- [16] B. M. W. Diederens, J. P. Bruin, J. W. den Boer, M. F. Peeters, and E. P. F. Yzerman, "Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 56, no. 9, article 1255, 2007.
- [17] D. S. J. Lindsay, W. H. Abraham, W. Findlay, P. Christie, F. Johnston, and G. F. S. Edwards, "Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 53, no. 3, pp. 183–187, 2004.
- [18] M. Maurin, L. Hammer, B. Gestin et al., "Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 16, no. 4, pp. 379–384, 2010.
- [19] P. Korosec, M. Silar, R. Erzen, and M. Kosnik, "The influence of antimicrobial therapy on the sensitivity of *Legionella* PCR," *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, vol. 38, no. 10, pp. 925–928, 2006.
- [20] B. M. W. Diederens, C. M. A. de Jong, J. A. J. W. Kluytmans, A. van der Zee, and M. F. Peeters, "Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of the literature," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 55, no. 5, pp. 639–642, 2006.
- [21] T. Miyara, K. Tokashiki, T. Shimoji, K. Tamaki, M. Koide, and A. Saito, "Rapidly expanding lung abscess caused by *Legionella pneumophila* in immunocompromised patients: a report of two cases," *Internal Medicine*, vol. 41, no. 2, pp. 133–137, 2002.
- [22] K. M. A. O'Reilly, M. A. Urban, T. Barriero, R. F. Betts, and D. R. Trawick, "Persistent culture-positive *Legionella* infection in an immunocompromised host," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 40, no. 10, pp. e87–e89, 2005.
- [23] C. Schindel, U. Siepmann, S. Han et al., "Persistent *Legionella* infection in a patient after bone marrow transplantation," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 11, pp. 4294–4295, 2000.
- [24] L. S. Tkatch, S. Kusne, W. D. Irish, S. Krystofiak, and E. Wing, "Epidemiology of *Legionella* pneumonia and factors associated with *Legionella*-related mortality at a tertiary care center," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 27, no. 6, pp. 1479–1486, 1998.
- [25] H. Yu, F. Higa, M. Koide et al., "Lung abscess caused by *Legionella* species: implication of the immune status of hosts," *Internal Medicine*, vol. 48, no. 23, pp. 1997–2002, 2009.

3 Optimisation et développement de méthodes d'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements respiratoires

Publication n°2 :

Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of Legionella species from respiratory samples.

G. Descours, P. Cassier, F. Forey, C. Ginevra, J. Etienne, G. Lina, S. Jarraud

Accepté pour publication à *Journal of Microbiological Methods*.

La mise en culture de prélèvements respiratoires pour recherche de légionelles est pratiquée par de nombreux laboratoires en France.

Si le diagnostic de légionellose peut être rapidement établi par détection des antigènes urinaires ou par PCR sur prélèvement respiratoire, l'isolement des souches cliniques de *Legionella* reste une étape indispensable aux investigations épidémiologiques autour des cas. Différentes techniques de typage définies au niveau européen sont appliquées aux isolats cliniques et environnementaux qui nous sont adressés :

- typage phénotypique comprenant l'identification de l'espèce et du sérotype par des techniques d'agglutination et/ou d'immunofluorescence et l'identification du sous-groupe (réactivité avec des anticorps monoclonaux dont MAb 3/1) selon le panel de Dresden [142, 155] ;
- typage génotypique comprenant la détermination du profil de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé [156] et la détermination du *Sequence Type* basé sur le séquençage de 7 gènes de ménage ou de virulence [436, 437].

Dans le cas d'échecs thérapeutiques, l'isolement des souches cliniques à partir de prélèvements respiratoires est également une étape clé pour la réalisation d'antibiogrammes et la détection d'éventuels mutants résistants. En effet, les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *Legionella* aux macrolides n'étant pas caractérisés, seul l'antibiogramme permet un dépistage de ces résistances.

En France, parmi les cas de légionellose déclarés en 2012, une souche clinique a été isolée dans 24% des cas (données InVS). Au Centre National de Référence des Légionelles, la sensibilité de la culture sur une période plus importante (2010 – 2012) atteignait 52,5%. Les facteurs intervenant dans les différences de sensibilités observées d'un laboratoire à un autre sont multiples : biais de recrutement et sensibilisation des laboratoires correspondants pour le CNR, expérience du personnel technique, réalisation de pré-traitements chimique

et/ou thermique inhibant la flore contaminante, nature et nombre des milieuxensemencés... La qualité des milieux de cultureensemencés semble jouer un rôle central. Cependant, aucune étude comparative évaluant les performances des milieux commercialisés pour l'isolement de souches cliniques n'avait été publiée. Les évaluations des milieux réalisées à partir de prélèvements environnementaux présentaient des résultats contradictoires, en particulier pour le milieu GVPC.

Dans cette étude, nous avons montré que les milieux BCYE et GVPC (probablement très utilisés car imposés par la norme NF T90-431 pour la culture des prélèvements environnementaux) présentaient des performances bien inférieures aux milieux MWY et BMPA, les milieux MWY et BMPA étaient caractérisés par une faible contamination par la flore oro-pharyngée et par des performances supérieures pour les prélèvements présentant un faible inoculum de *Legionella*. L'ensemencement des prélèvements respiratoires sur milieu GVPC n'est donc pas recommandé par le CNR.

Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples.

Descours G¹⁻⁶, Cassier P¹⁻⁷, Forey F⁶, Ginevra C¹⁻⁶, Etienne J¹⁻⁶, Lina G¹⁻⁶, Jarraud S¹⁻⁶

¹ CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France

² Inserm, U1111, Lyon, France

³ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

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

⁵ CNRS, UMR5308, Lyon, France

⁶ Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, *Legionella* National Reference Center, East Biology & Pathology Center, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France

⁷ Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Infection Control Unit, 5 Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France

Corresponding author

Ghislaine Descours

Email address: ghislaine.descours@univ-lyon1.fr

Postal address: Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, *Legionella* National Reference Center, East Biology & Pathology Center, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France

Phone number: +(33)4 78 77 86 57

Abstract

Culture media performance is a critical factor in the isolation of *Legionellae* from respiratory samples. We showed that BMPA and MWY media yielded significantly higher isolation rates than GVPC and BCYE media in regard to performance with samples that harbored low *Legionella* inocula and low contamination levels.

Keywords

Legionella, respiratory samples, isolation, MWY, BMPA, GVPC, BCYE

1 Legionnaires' disease (LD), a severe form of pneumonia, is mainly diagnosed by
2 urinary antigen detection. Nevertheless, *Legionellae* isolation from respiratory secretions by
3 culture is considered the gold standard for diagnosis because of its superior specificity. All
4 *Legionella* species and serogroups can be detected by culture, as it allows epidemiological
5 typing and susceptibility testing.

6 The reported culture sensitivities range widely from less than 10% to 80%, reflecting the
7 difficulties in improving the isolation of this fastidious and slow-growing bacteria (Murdoch,
8 2003). Laboratories experienced in *Legionellae* isolation are more likely to recover the
9 organism. Delays in respiratory sample processing, the prior use of antimicrobial therapies
10 and culture overgrowth by other oropharyngeal bacteria are additional factors that limit the
11 culture yields.

12 Over the last decades, specific formulated media have been developed, resulting in several
13 buffered charcoal yeast extract (BCYE) agars with or without selective added agents that
14 inhibit competing flora (Edelstein, 1981). The culture media quality is a critical factor in
15 *Legionellae* isolation. Several studies have been performed to compare these selective
16 media during *Legionellae* isolation from water samples (Edelstein, 1982, Luck et al., 2004,
17 Reinthaler et al., 1993, Ta et al., 1995). However, their performances in *Legionellae* isolation
18 from human samples have not yet been evaluated. Therefore, we performed a comparative
19 assessment of four commercially available media for *Legionellae* recovery from respiratory
20 samples.

21 This prospective study included 328 patients with suspected LD who were admitted to
22 French hospitals from September 2010 to June 2012. A LD case was defined as a patient
23 with clinical and/or radiological findings compatible with pneumonia and at least one of the
24 following positive tests for *Legionella*: urinary antigen, axenic culture, amoebic coculture,
25 *Legionella*-specific PCR and nested sequence-based typing (Descours et al., 2012, Ginevra
26 et al., 2009, Jarraud et al., 2013). A total of 328 respiratory samples (127 sputa, 61 tracheo-
27 bronchial aspirations (TBA) and 140 broncho-alveolar lavages (BAL)) were collected. If
28 necessary, the sputa were liquefied with dithiothreitol (Sputasol®, Oxoid, Dardilly, France).

29 The non-selective medium used in this study was buffered charcoal yeast extract (BCYE)
30 agar (Oxoid). The selective media were BCYE supplemented with cefamandole (4 mg/L),
31 polymyxin B (80,000 UI/L) and anisomycin (80 mg/L; BMPA medium; Oxoid); BCYE
32 supplemented with glycine (3 g/L), vancomycin (1 mg/L), polymyxin B (80,000 UI/L) and
33 cycloheximide (80 mg/L; GVPC medium; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and BCYE
34 supplemented with glycine (3 g/L), vancomycin (1 mg/L), polymyxin B (50,000 UI/L) and
35 anisomycin (80 mg/L; MWY medium; Oxoid). The axenic culture was performed within 24
36 hours of arrival at the laboratory. Specimens that were not immediately plated were
37 refrigerated at 4°C until processed. From each sample, 100 µL were inoculated without heat
38 or acid pretreatment onto five plates, 1 BCYE, 2 BMPA, 1 GVPC and 1 MWY. The inoculated
39 plates were incubated for 10 days at 35°C in an aerobic atmosphere (BCYE, BMPA) or in a
40

2.5% CO₂ atmosphere (BMPA, GVPC, MWY) and inspected on days 3, 5 and 10 after inoculation. The presumptive colonies were subcultured on BCYE agar plates and serogrouped with latex agglutination (Slidex® *Legionella* kit, BioMérieux) and polyclonal antibodies produced in our laboratory for indirect fluorescent antibody staining (Jarraud, Descours, Ginevra, Lina and Etienne, 2013).

Among the 328 patients, 183 LD cases were diagnosed; these comprised 178 *L. pneumophila* and 5 other *Legionella* species. A total of 96 samples were culture-positive for *L. pneumophila* according to one to five plates (sensitivity, 52.5%), including 93 samples with *L. pneumophila* serogroup 1 (Lp1), and 1 each with Lp2, Lp5 and Lp8. No other *Legionella* species grew. Most cultures (95.7%) were positive on days 3 or 5. The sampling type did not lead to statistically significant differences in the culture performances ($p=0.079$, Chi-Square test).

Significant differences in *Legionella* recovery from the respiratory samples were observed for the five inoculated plates ($p<0.001$, Chi-Square test). Their respective performances were BMPA (2.5% CO₂), 41%; MWY (2.5% CO₂), 40.4%; BMPA (air), 37.7%; GVPC (2.5% CO₂), 25.7% and BCYE (air), 21.3%. The differences observed between the performances of BMPA plates with respect to their incubation atmospheric conditions did not reach statistical significance ($p=0.52$, Chi-Square test). The differences observed between the five inoculated plates correlated with low *Legionella*-load samples (<10 CFU/plate) ($p<0.0001$, Chi-Square test) (Figure 1). Similarly, significant differences in sample contamination by oropharyngeal flora were observed ($p<0.001$, Chi-Square test; Figure 2). BMPA and MWY were the most sensitive and least contaminated media. The combined isolation rate for the BMPA and MWY plates yielded a sensitivity of 48.1%.

When selecting an appropriate culture method, maximal sensitivity for the isolation of *Legionella* strains is desirable. A major factor is the quality of the culture media used. To our knowledge, there are no published data regarding the performances of commercially available agar plates, although *Legionella* isolation from respiratory samples is performed in several laboratories.

We found that selective media supplemented with antibiotics and antifungals yielded significantly higher isolation rates than BCYE medium, as demonstrated by Leoni *et al.* with hot water systems (Leoni and Legnani, 2001). Among these, the higher recovery rates obtained with MWY and BMPA media were related to their performances with samples that harbored low levels of *Legionella* inocula and their low contamination levels. Several authors demonstrated similar results with hot water samples, whereas Reinthaler *et al.* observed no differences between culture media before heat or acid pretreatment (De Luca *et al.*, 1999, Edelstein, 1982, Luck, Igel, Helbig, Kuhlisch and Jatzwauk, 2004).

Our results suggest that the combination of MWY and BMPA plates provides an efficient *Legionella* isolation rate from respiratory specimens. However, in our study, the isolated

1 strains were all *L. pneumophila*. The glycine and cefamandole contained in these media
2 have been shown to possibly inhibit the growth of any non-*pneumophila* species (Lee et al.,
3 1993, Ta, Stout, Yu and Wagener, 1995). The use of BCYE, in addition to MWY and BMPA
4 plates, might be recommended to extend the culture sensitivity to other *Legionella* species.
5 Moreover, sample processing by heat or acid buffer pretreatment, which was not evaluated
6 in this study, is also critical to increase the culture sensitivity by reducing the overgrowth of
7 other bacteria (Buesching et al., 1983, Edelstein et al., 1982). The combination of an optimal
8 culture media choice and sample pretreatment could enhance the isolation of *Legionella*
9 strains from overgrown respiratory samples.
10
11
12
13
14

15 References

- 16 Buesching, W.J., Brust, R.A., Ayers, L.W., 1983. Enhanced primary isolation of *Legionella*
17 *pneumophila* from clinical specimens by low-pH treatment. J Clin Microbiol. 17, 1153-1155.
18 De Luca, G., Stampi, S., Lezzi, L., Zanetti, F., 1999. Effect of heat and acid decontamination
19 treatments on the recovery of *Legionella pneumophila* from drinking water using two
20 selective media. New Microbiol. 22, 203-208.
21 Descours, G., Suet, A., Ginevra, C., Campese, C., Slimani, S., Ader, F., Che, D., Lina, G.,
22 Jarraud, S., 2012. Contribution of amoebic coculture to recovery of *Legionella* isolates from
23 respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months. J Clin Microbiol. 50,
24 1725-1726.
25 Edelstein, P.H., 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella*
26 *pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J Clin Microbiol. 14,
27 298-303.
28 Edelstein, P.H., 1982. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella*
29 *pneumophila* from potable water. J Clin Microbiol. 16, 697-699.
30 Edelstein, P.H., Snitzer, J.B., Bridge, J.A., 1982. Enhancement of recovery of *Legionella*
31 *pneumophila* from contaminated respiratory tract specimens by heat. J Clin Microbiol. 16,
32 1061-1065.
33 Ginevra, C., Lopez, M., Forey, F., Reyrolle, M., Meugnier, H., Vandenesch, F., Etienne, J.,
34 Jarraud, S., Molmeret, M., 2009. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing
35 method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. J
36 Clin Microbiol. 47, 981-987.
37 Jarraud, S., Descours, G., Ginevra, C., Lina, G., Etienne, J., 2013. Identification of *Legionella*
38 in clinical samples. Methods Mol Biol. 954, 27-56.
39 Lee, T.C., Vickers, R.M., Yu, V.L., Wagener, M.M., 1993. Growth of 28 *Legionella* species on
40 selective culture media: a comparative study. J Clin Microbiol. 31, 2764-2768.
41 Leoni, E., Legnani, P.P., 2001. Comparison of selective procedures for isolation and
42 enumeration of *Legionella* species from hot water systems. J Appl Microbiol. 90, 27-33.
43 Luck, P.C., Igel, L., Helbig, J.H., Kuhlisch, E., Jatzwauk, L., 2004. Comparison of
44 commercially available media for the recovery of *Legionella* species. Int J Hyg Environ
45 Health. 207, 589-593.
46 Murdoch, D.R., 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin Infect Dis. 36, 64-69.
47 Reinthaler, F.F., Sattler, J., Schaffler-Dullnig, K., Weinmayr, B., Marth, E., 1993.
48 Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from
49 tap water in hospitals. J Clin Microbiol. 31, 1213-1216.
50 Ta, A.C., Stout, J.E., Yu, V.L., Wagener, M.M., 1995. Comparison of culture methods for
51 monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for
52 standardization of such methods. J Clin Microbiol. 33, 2118-2123.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure(s)

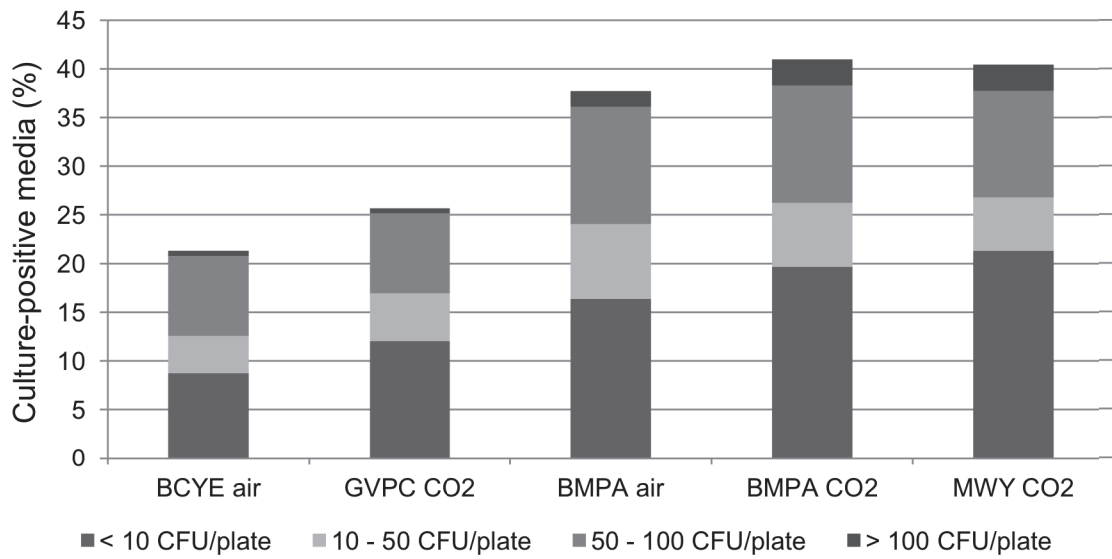


Figure 1. Media performances with regard to the number of *Legionella* colonies on BCYE, GVPC, BMPA and MWY plates.

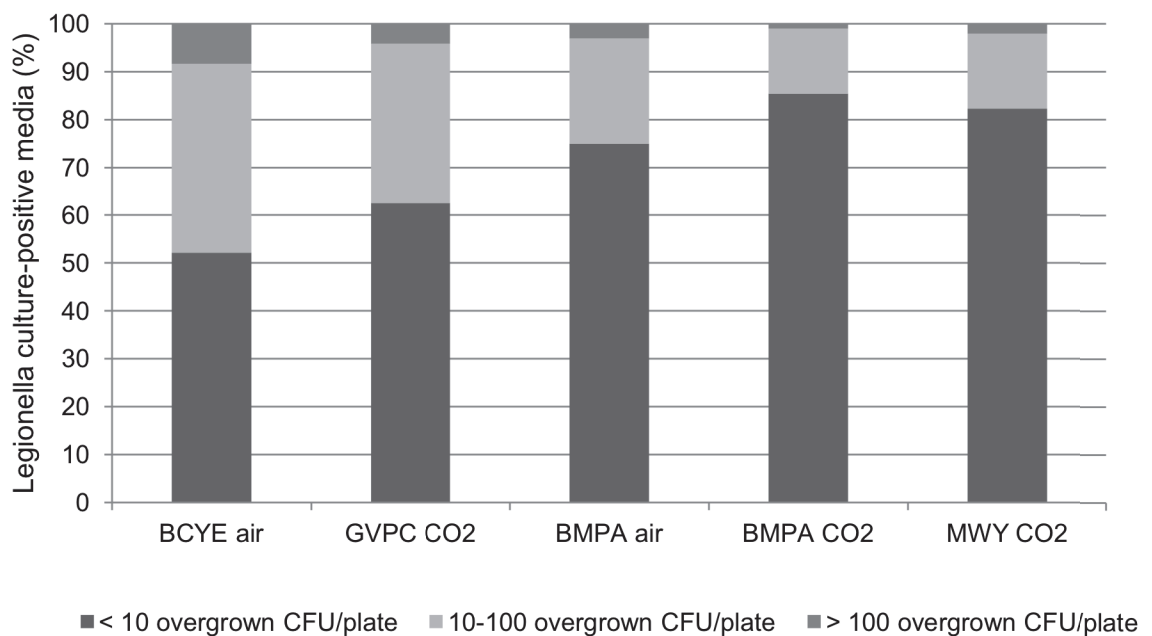


Figure 2. Other bacterial overgrowth of BCYE, GVPC, BMPA and MWY among *Legionella* culture-positive media.

Publication n°3 :

Contribution of amoebic coculture to recovery of Legionella isolates from respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months

G. Descours, A. Suet, C. Ginevra, C. Campese, S. Slimani, F. Ader, D. Che, G. Lina, S. Jarraud

Journal of Clinical Microbiology. 2012 May;50(5):1725-6.

La technique de co-culture amibienne à partir de prélèvements respiratoires a été décrite pour la première fois en 1983 par Robowtham sur des amibes du genre *Acanthamoeba* [165]. Les prélèvements étaient liquéfiés puis lavés afin d'éliminer les composants susceptibles d'inhiber la croissance de *Legionella* (dithiothréitol, antibiotiques, nutriments favorisant la croissance des bactéries commensales oro-pharyngées...) puis mis en contact avec les amibes. La technique initialement décrite comportait trois phases d'enrichissement amibien : la première en milieu liquide et les deux suivantes en milieu gélosé. Une adaptation du protocole pour deux enrichissements en milieu liquide a été proposée par La Scola *et al.* [168]. Cette technique de co-culture amibienne a été mise en place au CNR en 2007, puis a été simplifiée pour une technique en un temps, la seconde étape d'enrichissement n'ayant pas fait ses preuves.

L'objectif de la co-culture amibienne était d'améliorer l'isolement des souches de *Legionella*, en particulier en cas de culture négative, en mettant à profit les propriétés des amibes :

- décontamination des bactéries de la flore oro-pharyngée qui ne sont pas des ARB ;
- amplification qui découle de la multiplication de *Legionella* au sein des amibes ; la co-culture permet d'isoler des légionelles à partir de spécimens contenant un faible inoculum bactérien qui devient détectable par subculture sur milieu gélosé ;
- mise en évidence des LLAPs qui deviennent détectables par PCR sur le produit de co-culture ;
- restauration du caractère cultivable des légionelles présentes sous forme VBNC.

Bien que plusieurs cas cliniques aient démontré l'apport de la co-culture amibienne dans l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements cliniques, aucune évaluation à large échelle n'avait été réalisée [166-168].

Contrairement aux cas rapportés dans la littérature, notre étude a montré que la co-culture présentait une sensibilité inférieure à la culture (33% *versus* 42%). Son intérêt réside principalement dans la décontamination des prélèvements et son association à la culture permet d'atteindre un taux d'isolement de *Legionella* égal à 47%. L'inoculation de plusieurs espèces amibiennes pourrait permettre d'améliorer la sensibilité de la technique, mais semble plus difficilement applicable dans la pratique quotidienne.

Contribution of Amoebic Coculture to Recovery of *Legionella* Isolates from Respiratory Samples: Prospective Analysis over a Period of 32 Months

G. Descours,^{a,b,c,d} A. Suet,^{a,b,c,d} C. Ginevra,^{a,b,c,d} C. Campese,^e S. Slimani,^{a,b,c,d} F. Ader,^{a,b,c,f} D. Che,^e G. Lina,^{a,b,c,d} and S. Jarraud^{a,b,c,d}

Université de Lyon, Lyon, France^a; INSERM U851, Lyon, France^b; Université Lyon1, IFR128, Lyon, France^c; Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Légionelles, Centre de Biologie et Pathologie Est, Bron, France^d; Institut de Veille Sanitaire, Saint Maurice, France^e; and Hospices Civils de Lyon, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France^f

We evaluated the contribution of amoebic coculture to the recovery of *Legionella* spp. from 379 respiratory samples. The sensitivity of axenic culture was 42.1%. The combination of axenic culture with amoebic coculture increased the *Legionella* isolation rate to 47.1%. Amoebic coculture was particularly efficient in isolating *Legionella* spp. from respiratory samples contaminated with oropharyngeal flora.

Legionella spp. are facultative intracellular Gram-negative bacteria that are ubiquitous in natural and man-made aqueous environments, in which they survive as free-living bacteria or, more commonly, as intracellular forms in amoebae (1). When humans inhale contaminated aerosols, legionellae can infect and replicate within lung macrophages and cause a severe pneumonia referred to as Legionnaires' disease (LD).

Urinary antigen detection is the first-line diagnostic test, although this test is limited to *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1) (7). Molecular techniques improve LD diagnosis by detecting other serogroups and species. Nevertheless, isolation of *Legionella* strains is required to perform further epidemiological investigations. The sensitivity of axenic culture ranges from 15% to 90%, depending on the *Legionella* inoculum, the level of contamination of the samples with oropharyngeal flora, the prior use of antibiotics, and the experience of the laboratory members (2, 4). Several authors have described amoebic coculture as a method to recover *Legionella* spp. from culture-negative specimens (3, 8, 10–12). However, large-scale studies evaluating the benefit of amoebic coculture in routine laboratory practice are lacking.

In this work, we evaluated the contribution of amoebic coculture to the recovery of *Legionella* spp. from 379 respiratory samples collected over a period of 32 months.

This prospective study included 348 patients with suspected LD who were admitted to 98 French hospital facilities from April 2008 to November 2010. An LD case was defined as a patient with clinical and/or radiological findings compatible with pneumonia and at least one positive test for *Legionella* spp.; the tests conducted were detection of urinary antigen by an immunochromatographic test and axenic culture and amoebic coculture of a respiratory sample. A total of 379 pulmonary samples consisting of 168 sputum, 48 tracheobronchial aspiration (TBA), and 163 bronchoalveolar lavage (BAL) samples sent to the French National Reference Center of *Legionella* for diagnosis or epidemiological investigations were collected and processed by both axenic culture and amoebic coculture.

Axenic culture was performed upon sample arrival at the laboratory. The samples were liquefied using dithiothreitol (Sputasol; Oxoid, Dardilly, France) if necessary. One hundred microliters was inoculated onto five plates: buffered charcoal yeast extract (BCYE α medium; Oxoid); BCYE supplemented

with cefamandole, polymyxin, and anisomycin (BMPA medium; Oxoid) (two plates); BCYE supplemented with glycine, vancomycin, polymyxin B, and cycloheximide (GVPC medium; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France); and tryptone soy sheep blood agar (TSS medium; bioMérieux). The plates were incubated for 10 days at 35°C in an aerobic atmosphere (BCYE α , BMPA, and TSS media) or in a 2.5% CO₂ atmosphere (BMPA and GVPC media). Acid decontamination (HCl, pH 2, 30 min at room temperature; neutralized with NaOH, pH 11) or heat treatment (50°C, 30 min) was performed 24 h later for cultures contaminated with oropharyngeal flora.

Amoebic coculture was performed weekly, and the samples were stored at +4°C until coculture. *Acanthamoeba polyphaga* (Linc AP-1; from April 2008 to April 2009) or *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30234; from May 2009) was grown in peptone-yeast extract-glucose medium at 30°C (8). Amoebae were suspended in Page's amoebic saline (PAS) buffer, and 10⁶ amoebae were distributed into each well of a six-well tissue culture plate (BD Falcon; Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). One milliliter of the sample was mixed with sterile distilled water (3 ml) to disrupt the cells and centrifuged (1,000 rpm, 5 min). The supernatant was removed and centrifuged (10,000 rpm, 10 min). The pellet was suspended in PAS buffer (200 μ l) and inoculated into an amoeba culture. The plate was centrifuged (1,500 rpm, 20 min) and then incubated at 30°C. Three days after inoculation, the plate was gently shaken to suspend the amoebae. One hundred microliters of the infected amoebic suspension was subcultured on BCYE and BMPA media incubated for 10 days at 35°C in a 2.5% CO₂ atmosphere. One hundred microliters was inoculated onto a second amoebic plate. After a 3-day incubation of the sec-

Received 1 December 2011 Returned for modification 28 December 2011

Accepted 1 February 2012

Published ahead of print 8 February 2012

Address correspondence to G. Descours, ghislaine.descours@univ-lyon1.fr.

G.D. and A.S. contributed equally to this work.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.06531-11

TABLE 1 Isolation of *Legionella* strains from 240 samples from patients with LD by axenic culture and amoebic coculture

Axenic culture result	No. (%) of amoebic cocultures		
	Positive	Negative	Total
Positive	69 ^a	32 ^b	101 (42.1)
Negative	12 ^c	127	139 (57.9)
Total	81 (33.8)	159 (66.2)	240

^a 67 Lp1, 1 Lp3, and 1 Lp8.

^b 32 Lp1.

^c 11 Lp1 and 1 Lp8.

ond plate, 100 μ l of the suspension was subcultured as previously described.

Identification of *Legionella* spp. was performed by latex agglutination (Oxoid, bioMérieux); the Lp1 isolates were typed using Dresden monoclonal antibody (MAb) subgrouping (6) and sequence-based typing (5, 9).

Among 348 patients, 222 cases of LD corresponding to 240 samples were confirmed. The *Legionella* urinary antigen assay was positive in 217 cases (sensitivity, 98%). A total of 113 *Legionella* isolates were recovered by axenic culture and/or amoebic coculture (Table 1). Axenic culture isolated 101 *Legionella* strains (99 Lp1, 1 Lp3, 1 Lp8), yielding a sensitivity of 42.1%. Amoebic coculture demonstrated lower sensitivity than axenic culture (33.8% versus 42.1%, $P = 0.004$; chi-square test). Performing the amoebic coculture weekly and refrigerating and pretreating the samples may have impaired *Legionella* viability and reduced the actual coculture isolation rate. However, amoebic coculture recovered 12 additional strains (11 Lp1, 1 Lp8) and increased the global isolation rate to 47.1%. The 12 corresponding samples were all highly contaminated with oropharyngeal flora, in comparison to 12% (8/69) of the samples recovered by both methods and 19% (6/32) of the samples recovered by axenic culture only. These results suggest that amoebae supporting *Legionella* growth eliminated the interfering oropharyngeal flora (10). Among these 12 strains, amoebic coculture recovered 2 from samples from patients negative for antigenuria (1 Lp1 Knoxville, 1 Lp8). No significant difference between the performance of *A. castellanii* and that of *A. polyphaga* was observed (the sensitivities of cocultures with these amoeba species were 30% and 36%, respectively [$P = 0.29$; chi-square test]). The type of sample significantly impacted the performance of axenic culture and amoebic coculture (Table 2). The highest sensitivities were obtained with BAL fluid by both methods. No significant difference in the sequence type or MAb subgrouping of the strains isolated by one or the other method was observed.

In this study, we showed that the combination of amoebic coculture with axenic culture enhanced the rate of *Legionella* isolation from respiratory samples and allowed further epidemiological investigations. Amoebic coculture was particularly efficient in isolating *Legionella* spp. from respiratory samples contaminated

TABLE 2 Sensitivities of axenic culture, amoebic coculture, and a combination of the two according to the sample type

Sample type (<i>n</i>) or parameter	% Sensitivity (<i>n</i>)		
	Axenic culture	Amoebic coculture	Combination of axenic culture and amoebic coculture
BAL fluid (53)	64.2 (34)	50.9 (27)	66.0 (35)
TBA (37)	45.9 (17)	27.0 (10)	51.4 (19)
Sputum (150)	33.3 (50)	29.3 (44)	39.3 (59)
Total (240)	42.1 (101)	33.8 (81)	47.1 (113)
<i>P</i> value ^a	0.001	0.011	0.003

^a Chi-square test.

with oropharyngeal flora and may be systematically applied to such samples.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to B. La Scola and P. E. Fournier (Unité des Rickettsies, Marseille, France) for kindly providing *A. castellanii* and *A. polyphaga*.

REFERENCES

1. Abu Kwaik Y, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS. 1998. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3127–3133.
2. Blyth CC, Adams DN, Chen SCA. 2009. Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection. *N. S. W. Public Health Bull.* 20:157–161.
3. Fallon RJ, Rowbotham TJ. 1990. Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *J. Clin. Pathol.* 43:479–483.
4. Fields BS, Benson RF, Besser RE. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:506–526.
5. Gaia V, et al. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 43:2047–2052.
6. Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, Pelaz C, Lück PC. 1997. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 35:2841–2845.
7. Helbig JH, et al. 2003. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* 41:838–840.
8. La Scola B, Mezi L, Weiller PJ, Raoult D. 2001. Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *J. Clin. Microbiol.* 39:365–366.
9. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding *N*-acylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 45:1965–1968.
10. Rowbotham TJ. 1983. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J. Clin. Pathol.* 36:978–986.
11. Rowbotham TJ. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33:1179–1183.
12. Seno M, Sakaki M, Ogawa H, Matsuda H, Takeda Y. 2006. Effective proliferation of low level *Legionella pneumophila* serogroup 1 cells using coculture procedure with *Acanthamoeba castellanii*. *J. Microbiol. Methods* 66:564–567.

4 Etude intracellulaire des associations d'antibiotiques sur *Legionella pneumophila*

Publication n°4 :

Rifampicin-macrolide synergy against Legionella pneumophila serogroup 1 in human macrophages using a quantitative real-time PCR assay.

Descours G, Ginevra C, Ader F, Forey F, Lina G, Etienne J, Jarraud S.

International Journal of Antimicrobial Agents. 2011 Aug;38(2):188-9.

Selon les dernières recommandations de l'Afssaps (2011), une bi-antibiothérapie est indiquée dans les légionelloses sévères et/ou de l'immunodéprimé. En l'absence de résistances décrites à ce jour sur des souches cliniques de *L. pneumophila*, l'intérêt thérapeutique des associations d'antibiotiques réside dans l'obtention d'une synergie. Cependant, les données de la littérature ne font pas la preuve de cette synergie et remettent ainsi en cause l'indication d'une bi-antibiothérapie dans la prise en charge des légionelloses.

Les études des associations *in vitro* sur *Legionella*, bien qu'abondantes, semblent difficilement interprétables en raison de méthodologies souvent peu adaptées : études extracellulaires ne considérant pas la pénétration des antibiotiques dans les cellules infectées, absence de détermination des CMIE préalable à l'étude des associations sur des modèles intracellulaires, diversité de l'interprétation de l'index FIC...

Les données sur modèle animal se limitent à deux études sur des cobayes et montrent une indifférence pour les associations rifampicine – ciprofloxacine et rifampicine – érythromycine. D'autre part, à l'exception de l'étude récente de Rello *et al.* (d'effectif limité à 25 patients) [279], les données cliniques publiées ne montrent aucun bénéfice des bithérapies sur les monothérapies en terme de survie et de survenue de complications. A l'inverse, les associations d'antibiotiques semblent associées à une durée d'hospitalisation prolongée et des complications accrues.

Nous avons donc formulé l'hypothèse qu'un antagonisme entre antibiotiques pourrait contribuer aux échecs thérapeutiques. A partir d'un modèle monocyttaire humain U-937, nous avons évalué plusieurs associations d'antibiotiques sur la souche endémique *L. pneumophila* « Paris ». Nous n'avons pas montré d'antagonisme, mais au contraire une synergie entre macrolides et rifampicine. Les macrolides et la rifampicine présentent un métabolisme hépatique et plusieurs études cliniques ont montré que leur association induisait une toxicité hépatique accrue et de nombreuses interactions médicamenteuses en particulier avec les traitements immunosuppresseurs. Malgré l'effet synergique observé entre macrolides et rifampicine dans notre étude, et sur la base des données cliniques, nous ne recommandons donc pas cette association d'antibiotiques dans le traitement des légionelloses sévères.

effusions, hypoalbuminaemia, huge fluid replacement, diuretics or vasoactive drugs, drains and hyperdynamic condition, the 25 mg/L target plasma concentration could not be easily achieved even with very high doses of vancomycin. Moreover, the risk of unacceptable toxicity would delay or impair, in turn, the set up of early appropriate treatment in such conditions. On the contrary, absence of the aforementioned factors influencing drug pharmacokinetics would allow attainment of the therapeutic threshold even with 2g/day continuous infusion, thus lessening the likelihood of drug toxicity.

Vancomycin pharmacodynamics shows drug penetration normally ranging between 20% and 35% within different infected organs and tissues. It has recently been confirmed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of MRSA plays a major role in affecting the clinical outcome of ICU patients with pneumonia treated with vancomycin [5]. The higher the MIC, the lower the likelihood of attaining a 24-h area under the concentration–time curve (AUC)/MIC ratio ≥ 400 , which is recognised as a major determinant of vancomycin efficacy on both sides of the Atlantic. Thus, updated local distribution of MICs should drive the decision about the most appropriate antimicrobial choice in empirical therapy, according to the target site of infection. Indeed, other drugs active against MRSA should sometimes be taken into consideration for empirical or targeted MRSA infection therapy, with the decision relying both on their own pharmacodynamic properties as well as the minimal daily dose and dosing adjustment required by individual patient characteristics. The game to play is not only about optimising vancomycin administration but also about the features of MRSA strains that we face in our own ICU as well as the choice of the right drug, at an adequate concentration within the target site, in a timely manner. Perhaps the time has come to rethink about ‘getting it right first’.

Funding: No funding sources.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Jeurissen A, Sluyts I, Rutsaert R. A higher dose of vancomycin in continuous infusion is needed in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:75–7.
- [2] Taccone FS, Jacobs F. Optimising vancomycin doses in continuous infusion for septic patients. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:385, author reply 385–6.
- [3] Liu C, Bayer A, Cosgrove S, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 2011;52:1–38.
- [4] Pea F, Viale P. Bench-to-bedside review: appropriate antibiotic therapy in severe sepsis and septic shock—does the dose matter? *Crit Care* 2009;13:214.
- [5] Choi EY, Huh JW, Lim C-M, Koh Y, Kim S-H, Choi S-H, et al. Relationship between the MIC of vancomycin and clinical outcome in patients with MRSA nosocomial pneumonia. *Intensive Care Med* 2011;37:639–47.

Leonardo Pagani*

Antimicrobial Management Program, Bolzano Central Hospital, Via L. Boehler 5, I-39100 Bolzano, Italy

*Tel.: +41 22 372 3851; fax: +41 22 372 3987.

E-mail address: leonardo.pagani@asbz.it

18 April 2011

doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.04.009

Rifampicin–macrolide synergy against *Legionella pneumophila* serogroup 1 in human macrophages using a quantitative real-time PCR assay

Sir,

Legionella pneumophila, the causative agent of Legionnaires' disease (LD), is an intracellular Gram-negative bacterium of envi-

ronmental origin. Upon inhalation, *L. pneumophila* can infect and replicate within lung macrophages. Fluoroquinolones and macrolides are the first-line therapies for LD. Guidelines regarding the therapeutic management of LD propose two options. The Infectious Diseases Society of America and the British Thoracic Society recommend a single-drug regimen using a fluoroquinolone or azithromycin (AZI). The European Respiratory Society suggests the addition of rifampicin (RIF) in cases of severe disease, although the benefit of combination therapy has not been demonstrated to date [1].

In this work, we evaluated several antibiotic combinations against *L. pneumophila* using the checkerboard method. An extracellular method by broth microdilution was compared with an intracellular method performed on *Legionella*-infected macrophages.

Five antibiotics, namely levofloxacin (LVX) (Sanofi-Aventis, Paris, France), erythromycin (ERY) (Fluka Biochemika, St-Quentin-Fallavier, France), AZI, clarithromycin (CLA) and RIF (Sigma, Paris, France) were tested at two-fold serial concentrations against *L. pneumophila* reference strain Paris CIP107629T. The minimal inhibitory concentration (MIC₉₀) and the minimal extracellular concentration inhibiting intracellular bacterial growth (MIEC₉₀) were determined before performing the checkerboard test.

The human U-937 cell line (ATCC CRL 1593.2) was used for intracellular susceptibility testing. Cells were distributed at 5×10^5 cells/mL in 24-well tissue culture plates (BD Falcon™; Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) in RPMI 1640 medium supplemented with glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 10% foetal bovine serum (BioWest, Nuaille, France) and 50 μM phorbol-12-myristate-13-acetate (Sigma, Paris, France). After 48 h of incubation, cells were washed and infected with *Legionella* at a multiplicity of infection of 1. Plates were centrifuged (5 min, 1500 rpm) and incubated for 2 h at 37 °C. Cell monolayers were washed to remove non-adherent bacteria and then antibiotic aliquots were added. An antibiotic-free control was conducted in triplicate in each experiment. After 72 h of incubation, DNA was extracted using a DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) and bacterial growth was quantified using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay (iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* Kit; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

The combinations LVX/ERY, LVX/RIF, ERY/RIF, AZI/RIF and CLA/RIF were studied in triplicate using the checkerboard test. Results were expressed using the lowest fractional inhibitory concentration (FIC) index (FICI): $FICI = FIC_A + FIC_B = MI(E)C_A$ in combination with B/MI(E)C_A alone + MI(E)C_B in combination with A/MI(E)C_B alone. Synergy was defined by a FICI ≤ 0.5 and indifference by a FICI > 0.5 to ≤ 4 .

Antimicrobial susceptibility testing results for *L. pneumophila* strain Paris were consistent with MIC₉₀ and MIEC₉₀ values previously reported for *L. pneumophila* sg1 (Table 1). The most active agent was RIF. Among the macrolides, CLA was the most active, followed by AZI and ERY. MIEC₉₀ values differed from MIC₉₀ values by one or two dilutions, and only LVX showed increased antimicrobial activity against intracellular *Legionella* (MIEC₉₀ < MIC₉₀). AZI showed the highest MIEC₉₀. However, since it is highly concentrated within infected macrophages, an equivalent activity to LVX against intracellular *L. pneumophila* has been reported. Because minor discrepancies are observed between MIC₉₀ and MIEC₉₀ values, extracellular methods are considered to be a relevant screening test for *Legionella* susceptibility.

Table 1 shows the effect of antibiotic combinations against *L. pneumophila* strain Paris. Synergy was observed between RIF and the macrolides using the intracellular method. In contrast, the extracellular method resulted in indifference. The other combinations tested (LVX/ERY and LVX/RIF) showed indifference by

Table 1
MIC₉₀ and MIEC₉₀ values and the effect of antibiotic combinations against *Legionella pneumophila* strain Paris.

Antibiotic combination (Antibiotic _A /Antibiotic _B)	Method	Antibiotics alone (Antibiotic _A /Antibiotic _B)	Antibiotics in combination at the FICI ^a (Antibiotic _A /Antibiotic _B)	Lowest FICI	Interpretation
LVX/ERY	MIC ₉₀ ^b	0.032/0.25	0.032/0.25	2	Indifference
LVX/ERY	MIEC ₉₀ ^c	0.016/0.5	0.016/0.5	2	Indifference
LVX/RIF	MIC ₉₀	0.032/0.0005	0.032/0.0005	2	Indifference
LVX/RIF	MIEC ₉₀	0.016/0.001	0.016/0.001	2	Indifference
ERY/RIF	MIC ₉₀	0.25/0.0005	0.125/0.00025	1	Indifference
ERY/RIF	MIEC ₉₀	0.5/0.001	0.125/0.00025	0.5	Synergy
AZI/RIF	MIC ₉₀	0.128/0.0005	0.032/0.00025	0.75	Indifference
AZI/RIF	MIEC ₉₀	0.512/0.001	0.128/0.00025	0.5	Synergy
CLA/RIF	MIC ₉₀	0.016/0.0005	0.004/0.00025	0.75	Indifference
CLA/RIF	MIEC ₉₀	0.032/0.001	0.008/0.00025	0.5	Synergy

FICI, fractional inhibitory concentration index; LVX, levofloxacin; ERY, erythromycin; RIF, rifampicin; AZI, azithromycin; CLA, clarithromycin.

^a Using the extracellular method, synergy was defined as no visible growth at 48 h at a FICI ≤ 0.5; using the intracellular method, synergy was defined as a 1 log₁₀ decrease in genome units after 72 h at a FICI ≤ 0.5.

^b Extracellular method: the MIC₉₀ value was defined as the lowest antibiotic concentration allowing no visible bacterial growth at 48 h, determined in triplicate with a final inoculum of 4 × 10⁵ colony-forming units/mL using a buffered yeast extract (BYE) broth microdilution method in 96-well microtitre plates.

^c Intracellular method: the MIEC₉₀ value was defined as the minimum extracellular concentration inducing a 1 log₁₀ decrease in genome units, determined in triplicate on the human U-937 cell line.

both methods. These results indicate the superiority of intracellular methods in evaluating antibiotic combinations.

Data on antibiotic combination testing for *L. pneumophila* are scarce. To our knowledge, synergy between macrolides and RIF against intracellular *L. pneumophila* has never been reported. Three studies showed indifference between ERY and RIF using human monocytes [2–4]. Two of these studies were not performed using the checkerboard method and without predetermination of MIEC values [2,3]. The combinations were studied at a single concentration above each antibiotic MIC. Vildé et al. [4] have proposed measurement of MIEC values in *Legionella*-infected monocytes before using the checkerboard method. *Legionella pneumophila* growth was quantified by colony counting and the ERY/RIF combination FICI was reported at 0.6. In the present work, *L. pneumophila* was quantified by a real-time PCR as previously described [5] and the ERY/RIF combination FICI was 0.5. The discrepancies observed in the ERY/RIF FICI may be related to the use of two quantification methods applied on two strains with distinct susceptibilities.

In humans, as the prevalence of LD is low, data regarding macrolide–RIF combinations are available from a few retrospective studies including a limited number of patients. No additional benefit is shown in comparison with single-regimen therapy using macrolides (greater lengths of stay, liver toxicity and drug interactions) [1].

In this work, we provide evidence that macrolides, particularly AZI, are synergistic with RIF against *Legionella* in an in vitro model. This finding may be useful to physicians who consider using antibiotic combinations for the treatment of LD.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the National Reference Center for *Legionella*, particularly Dominique Moret and Sami Slimani, for technical assistance.

Funding: This work was supported in part by grants from Sanofi-Aventis (Paris, France) and Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Grau S, Antonio JM, Ribes E, Salvadó M, Garcés JM, Garau J. Impact of rifampicin addition to clarithromycin in *Legionella pneumophila* pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:249–52.
- [2] Havlichek D, Saravolatz L, Pohlod D. Effect of quinolones and other antimicrobial agents on cell-associated *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1529–34.

- [3] Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Michelsen PB. Antibacterial effects of levofloxacin, erythromycin, and rifampin in a human monocyte system against *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3153–6.
- [4] Vildé JL, Dournon E, Rajagopalan P. Inhibition of *Legionella pneumophila* multiplication within human macrophages by antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:743–8.
- [5] Roch N, Maurin M. Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:866–71.

Ghislaine Descours^{a,b,c,d,*}

Christophe Ginevra^{a,b,c,d}

^a Université de Lyon, France

^b INSERM U851, 7 rue Guillaume Paradin, F-69372, France

^c Université Lyon 1, IFR128, France

^d Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Légionelles, Centre de Biologie et Pathologie Est, 59 Boulevard Pinel, Bron, France

Florence Ader^{a,b,c,d}

^a Université de Lyon, France

^b INSERM U851, 7 rue Guillaume Paradin, F-69372, France

^c Université Lyon 1, IFR128, France

^d Hospices Civils de Lyon, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de la Croix Rousse, 103 Grande rue de La Croix Rousse, F-69317 Lyon Cedex 04, France

Françoise Forey

Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Légionelles, Centre de Biologie et Pathologie Est, 59 Boulevard Pinel, Bron, France

Gerard Lina^{a,b,c,d}

Jerome Etienne^{a,b,c,d}

Sophie Jarraud^{a,b,c,d}

^a Université de Lyon, France

^b INSERM U851, 7 rue Guillaume Paradin, F-69372, France

^c Université Lyon 1, IFR128, France

^d Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des Légionelles, Centre de Biologie et Pathologie Est, 59 Boulevard Pinel, Bron, France

* Corresponding author. Present address: INSERM U851, Faculté de Médecine Laënnec, 7 rue Guillaume Paradin, F-69372 Lyon, France. Tel.: +33 4 78 77 86 57; fax: +33 4 78 77 86 58. E-mail address: ghislaine.descours@chu-lyon.fr (G. Descours)

5 April 2011

doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.05.001

5 Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides

Publication n°5 :

Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in Legionella pneumophila.

G. Descours, C. Ginevra, F. Forey, J. Chastang, N. Jacotin, J. Etienne, G. Lina, S. Jarraud
Rédaction en cours. Soumission prévue à *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Les mécanismes impliqués dans la résistance bactérienne aux macrolides sont nombreux. Afin de déterminer la nature de ces mécanismes chez *L. pneumophila*, nous avons généré en laboratoire de confinement L3 douze lignées de mutants résistants jusqu'à l'obtention de CMI multipliées par 4096 et/ou 20 passages :

- six lignées indépendantes de mutants résistants à l'érythromycine, antibiotique historique des légionelloses (Ery 1 à Ery 6) ;
- six lignées indépendantes de mutants résistants à l'azithromycine, antibiotique recommandé en première intention (Azi 1 à Azi 6).

La souche ancestrale à partir de laquelle les mutants ont été sélectionnés est la souche Paris. Cette souche endémique représente 10% des isolats cliniques en France. Son génome a été séquencé par l'Institut Pasteur (Paris). Il est disponible sur le lien suivant : <http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>.

La caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance a été réalisée sur les douze derniers passages, puis la chronologie d'apparition des mutations a été reconstituée à partir des passages intermédiaires congelés (se reporter à *Materials & Methods* ci-joint).

Le génome de la souche Paris ne présente aucune séquence homologue à des gènes codant des méthylases, des phosphotransférases ou des estérases responsables de la résistance aux macrolides chez d'autres genres bactériens. Nous avons donc suspecté un (des) mécanisme(s) de résistance par mutation(s) ribosomale(s) et/ou par efflux. Deux approches étaient alors possibles :

- une approche ciblée sur la base des données de la littérature mettant en œuvre des PCR spécifiques puis séquençages de l'ARNr 23S et des protéines L4 et L22 ;
- une approche non limitante par séquençage du génome total des lignées dans le but d'identifier des mécanismes additionnels et d'identifier des mutations potentielles compensatrices dont le rôle est de restaurer le *fitness* bactérien lorsque les mutations associées à la résistance présentent un fort coût énergétique pour la bactérie.

C'est cette seconde approche que nous avons retenue. Le séquençage des douze lignées résistantes et de la souche ancestrale Paris a été réalisé par la plateforme de génomique ProfileXpert par une technologie Illumina Hiseq 2000. L'analyse bio-informatique a également été réalisée par ProfileXpert. Les résultats du séquençage sont présentés dans le tableau, page suivante.

Nous avons différencié trois catégories de mutations :

- des mutations sur la cible ribosomale : ARNr 23S (3 copies) et protéines ribosomales L4 et L22, « attendues » car déjà décrites pour d'autres genres bactériens et présentes sur la totalité des lignées sélectionnées (en bleu dans le tableau ci-joint) ;
- des mutations potentiellement responsables de la résistance car affectant d'autres protéines ribosomales ou présentes dans ou en amont de gènes codant des protéines putatives d'efflux que l'on retrouve plus rarement : protéines L3, S19, Lpp2879/2880 (AcrA/B-like) (en jaune) ;
- des mutations dans des gènes codant les protéines d'efflux PhtA et Lpp0758, dans ou en amont de gènes codant le régulateur global de transcription Fis (3 copies) et dans des gènes mutés dans plusieurs lignées et codant des protéines de fonction inconnue : Lpp 3032, Lpp0836, Lpp0633 (en vert).

La publication n°5 actuellement en cours de rédaction se limitera à la description des mécanismes caractérisés dans la totalité des lignées résistantes aux macrolides soit les mutations sur les gènes codant l'ARNr 23S et les protéines ribosomales L4 et L22.

Legionella pneumophila possédant 3 copies de l'opéron ARNr 16S – 23S – 5S (deux étant identiques et différant de la 3^{ème} par 2 pb), nous avons développé des PCR spécifiques de chaque opéron en plaçant une amorce sens commune dans le gène codant l'ARNr 23S (en amont des mutations attendues) et trois amorces spécifiques anti-sens dans la séquence non codante post-5S (*Table 1*) :

	16 S	F commune	23 S	5 S	R1, R2, R3 spécifiques	
Op 1	345 pb		2783 pb	142 pb	126 pb	≠
Op 2	345 pb		2783 pb (2 pb ≠)	142 pb	126 pb	≠
Op 3	345 pb		2783 pb	142 pb	126 pb	≠

Position	Nucleotide ref.	Azi-1	Azi-2	Azi-2bis	Azi-3	Azi-4	Azi-5	Azi-6	Ery-1	Ery-2	Ery-3	Ery-4	Ery-5	Ery-6	Gene Name	Gene Function	
190213	T														CC	<i>crRNA CRISPR</i>	spacer 3
190390	G														AA	<i>crRNA CRISPR</i>	spacer 5
191966	T														TT	<i>crRNA CRISPR</i>	spacer 27
423692	C														GG	<i>crRNA CRISPR</i>	spacer 27
444776	C															<i>Ipp0371 = fade</i>	Acyl coenzyme A dehydrogenase
456725	G			TT												<i>tpoB</i>	RNA polymerase, beta subunit
457141	A															<i>tpiC</i>	50S ribosomal subunit protein L3
457144	A															<i>tpiD</i>	50S ribosomal subunit protein L4
457146	G															<i>tpiD</i>	50S ribosomal subunit protein L4
457147	G															<i>tpiD</i>	50S ribosomal subunit protein L4
457152	C	AA														<i>tpiD</i>	50S ribosomal subunit protein L4
457153	G	CC														<i>tpiD</i>	50S ribosomal subunit protein L4
457154	T	AA														<i>tpiD</i>	50S ribosomal subunit protein L4
457160	G	CC														<i>tpiD</i>	50S ribosomal subunit protein L4
458716	G				AA											<i>tpiD</i>	50S ribosomal subunit protein L4
459260	C						TT									<i>tpsS</i>	30S ribosomal subunit protein L4
459269	A															<i>tpiV</i>	50S ribosomal subunit protein L22
459272	G	AA														<i>tpiV</i>	50S ribosomal subunit protein L22
465107	G		TT													<i>tpiV</i>	50S ribosomal subunit protein L22
465159	C															<i>tpiV</i>	50S ribosomal subunit protein L22
472647	T															<i>secY</i>	SecYEG protein translocase auxiliary subunit
515136	C					CC			AA							<i>secY</i>	SecYEG protein translocase auxiliary subunit
641826	G	AA														<i>secY</i>	SecYEG protein translocase auxiliary subunit
650653	G															<i>suCA</i>	putative acyl carrier protein
653178	T			GG												<i>Ipp0424</i>	ankyrin protein, substrate of the Doi/cem secretion system
673888	G															<i>Ipp0469 = ankG</i>	2-oxoglutarate decarboxylase, thiamin-requiring
675302	C								AA							<i>Ipp0604 = phiA</i>	Major facilitator family transporter
680465	T															<i>Ipp0606 = fis</i>	global DNA-binding transcriptional dual regulator
680467	T																Amount de tyS (Tyrosyl-RNA synthetase) ET DE peptidase, M23/M37 family
682371	C								CC								Aval de tyS
684717	C					TT											Aval de 5S opéron 2
684842	G																glutathion reductase
685530	C																phosphate transporter
848742	C					TT											phosphate transporter
912227	C																phosphate transporter
936422	G																glycine C-acetyltransferase
936431	C																conserved protein of unknown function
936848	A				AA												conserved protein of unknown function
937087	T			CC													conserved protein of unknown function
982833	G																rod shape-determining protein Mre8
1156294	G				AA												conserved protein of unknown function
1478955	T																conserved protein of unknown function
1478981	G																entre <i>lpxB</i> et <i>fis</i>
1484792	G																<i>mrdA</i>
1677739	G																penicillin-binding protein 2
2112830	T				AA												putative Fe-S containing enzyme
2257523	G								CT								Fragment of conserved protein of unknown function (part 2)
2424024	C								CC								hypothetical protein (non Paris: twitching motility protein P11)
3164527	C																HYD family secretion protein
3188054	T																conserved membrane protein of unknown function (non Paris: inner membrane protein)
3224469	T																entre 16S et 23S opéron 3
3280761	T	AA															NADH dehydrogenase I chain F
3280785	C																Amount de <i>lpp2879</i>
3280786	A								GG								Amount de <i>lpp2879</i> (RBS ?)
3454239	A																Amount de <i>lpp2879</i> (RBS ?)
3454242	A																major outer membrane protein
3454288	G									TT							major outer membrane protein
3482352	A																major outer membrane protein
121011	G								AA								F1 sector of membrane-bound ATP synthase, alpha subunit
																	conserved protein of unknown function

Table 1. Primers used in this study.

Gene	Name	Primer sequence	Product size (bp)	MgCl ₂ conc. (mM)	PCR conditions
					Amplification conditions
<i>rrn^A</i> (copies no. 1,2,3)	F2	5'-AAGGCATAGACAGCCAGGAG-3'			
	R1.3	5'-GCTTGCTAACTCACACCAAC-3'	2573	1.5	1 cycle of 5 min at 95°C; 35 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 62°C, and 150 s at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C
<i>rrn^A</i> (copy no. 2)	R2".2	5'-CAAAGGAATCAGGGTAGG-3'	2566	1.5	1 cycle of 5 min at 95°C; 35 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 150 s at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C
	R3.2	5'-GAACCAACAAGCATTCTC-3'	2274	1.5	1 cycle of 5 min at 95°C; 35 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 150 s at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C
<i>rrn^S</i> (copies no. 1,2,3)	23S F	5'-AAGTTCGGACCTGCACGAAT-3'	859	-	-
	23S R	5'-GTA GTCTTCAACGGGCTTCA-3'			
<i>rplD</i>	L4_F	5'-AAAAGGTGCAATTCCTGGTG-3'	897	3	1 cycle of 5 min at 95°C; 35 cycles of 15 s at 94°C, 35 s at 50°C, and 50 s at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C
	L4_R	5'-CTGGTTTGTGGAAAGCGTTTAA-3'			
<i>rplV</i>	L22_F	5'-GCATTAACGCCAAAAGACCAC-3'	834	3	1 cycle of 5 min at 95°C; 35 cycles of 15 s at 94°C, 35 s at 50°C, and 50 s at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C
	L22_R	5'-AGCAATACCTTCAGCCACCA-3'			

rrn^A, primers used for DNA amplification; *rrn^S*, primers used for DNA sequencing.

Les mutants résistants à l'érythromycine ont été sélectionnés plus facilement que les mutants résistants à l'azithromycine en terme de niveau de résistance et de nombre de passages (CMI médiane de 1024 mg/L *versus* 256 mg/L, et de 10 passages *versus* 16 passages) (*Table 2*).

En adéquation avec les données de la littérature, nous avons montré que :

- les mutations dans les protéines ribosomales L4 (acides aminés 62 à 66) et L22 (acides aminés 87 et 91) étaient associées à un faible niveau de résistance (CMI multipliée par 0,5 à 16 par rapport à la souche ancestrale) ;
- les substitutions sur les gènes codant l'ARNr 23S portent sur les nucléotides 2051 à 2053 et la cytosine 2605 (respectivement 2057 à 2059 et 2611 chez *E. coli*) et sont associées à un niveau de résistance supérieur, avec des CMI multipliées par 2 à 4096 ;
- le niveau de résistance est corrélé à la nature du nucléotide muté : niveau de résistance inférieur pour les mutations sur le nucléotide 2057, intermédiaire à élevé pour le nucléotide 2611 et élevé pour les adénines 2058 et 2059.
- le niveau de résistance est corrélé au nombre d'opérons de l'ARNr 23S mutés (1 à 3).

Nous avons ensuite validé le lien entre les mutations observées sur ces lignées et le degré de résistance par une approche complémentaire par compétence naturelle (capacité naturelle à intégrer de l'ADN exogène) à partir de la souche Paris délétée pour le gène *dotA* (*defective in organelle trafficking*) donc avirulente, ce qui nous a permis de poursuivre ce travail expérimental en laboratoire de confinement L2. Les mutants ne présentaient aucune résistance croisée avec les autres classes d'antibiotiques (*Table 3*).

Les souches résistantes délétées pour le gène *dotA* n'ont pas montré de perte de *fitness*.

Nous poursuivons l'étude des mutations additionnelles. L'étude des mutations identifiées dans et en amont du gène *lpp2879* (organisé en opéron avec le gène *lpp2880*) codant des protéines putatives d'efflux AcrA/B-like dans les lignées Azi1 et Azi3 est actuellement en cours.

Table 2. Mutations detected in erythromycin and azithromycin-resistant *L. pneumophila* strains according to the step of evolution procedure.

Lineage ^a	Passage	Erythromycin or Azithromycin MIC (mg/L) ^b	Mutations in <i>rrn</i> (number of mutated copies) ^c	Mutations in L4 protein	Mutations in L22 protein
Ery 1	P2	1	-	G66D	-
	P6	4	G2057A (2/3)	G66D	-
	P7	16	G2057A (3/3)	G66D	-
	P9	32	G2057A (3/3) + A2058G (1/3)	G66D	-
	P11	1024	G2057A (3/3) + A2059C (3/3)	G66D	-
Ery 2	P1	0.5	-	Q62K	-
	P2	1	-	Q62R + G64E	-
	P8	16	C2611A (2/3) ^{dp}	Q62R + G64E	-
	P9	128	C2611A (3/3)	Q62R + G64E	-
	P10	1024	C2611G (3/3)	Q62R + G64E	-
Ery 3	P1	0.5	-	G66A	-
	P7	256	C2611T (2/3)	G66A	-
	P8	1024	C2611T (3/3)	G66A	-
Ery 4	P1	0.5	-	K65N	-
	P3	2	-	G66A	K90M
	P7	16	A2058T (2/3)	G66A	K90M
	P8	2048	A2058T (3/3)	G66A	K90M
	P12	1024	A2058T (2/3)	G66A	K90M
Ery 5	P1	0.5	-	K63Q ^{dp}	-
	P2	2	G2057A (3/3)	-	-
	P3	8	G2057A (3/3)	G66S	-
	P5	32	G2057A (3/3)	G66A	-
	P7	128	A2059G (2/3)	G66A	-
	P10	1024	A2058C (1/3) + A2059G (2/3)	G66A	-
	P12	1024	A2058C (2/3) + A2059G (1/3)	G66A	-
Ery 6	P3	1	-	G66D	-
	P4	2	C2611A (2/3)	G66D	-
	P5	8	C2611A (3/3)	G66D	-
	P8	64	C2611A (1/3) + C2611T (2/3)	G66D	-
	P9	1024	C2611T (3/3)	G66D	-
Azi 1	P3	1	-	G66R	-
	P4	1	-	T65K	-
	P5	8	-	G66R + T65K	-
	P8	16	C2611T (1/3) ^{dp}	G66R + T65K	-
	P10	128	C2611T (3/3)	G66R + T65K	-
	P12	256	C2611T (3/3)	G66R + T65K	G91D
Azi 2	P3	2	A2058G (3/3)	-	-
	P5	128	A2058G (2/3) ^{dp}	-	-
	P7	1024	A2058G (3/3)	G66D	-
Azi 3	P3	2	-	T65K	-
	P7	32	C2611T (3/3)	T65K	-
	P9	64	C2611T (3/3)	T65K + G66A	-
	P13	256	C2611T (3/3)	T65K + G66C	-
Azi 4	P3	1	-	del ₆₃ KG ₆₄	-
	P8	8	C2611G (2/3)	del ₆₃ KG ₆₄	-
	P9	256	C2611G (3/3)	del ₆₃ KG ₆₄	-
Azi 5	P2	2	-	T65K	-
	P3	8	-	T65K	G91D
	P11	16	-	T65K	P87L ^{dp} + G91D
	P12	32	A2058G (1/3) ^{dp}	T65K	P87L + G91D
	P13	1024	A2058G (3/3)	T65K	P87L + G91D
Azi 6	P3	8	C2611G (3/3)	-	-
	P8	2048	A2058G (3/3)	-	-

^a Selected by erythromycin (Ery 1 to Ery 6) or azithromycin (Azi 1 to Azi 6).

^b MICs determined for erythromycin (Ery 1 to Ery 6) or azithromycin (Azi 1 to Azi 6).

^c *E. coli* numbering ; ^{dp} Heterogeneous population. An additional part of bacterial mixture is mutated ; -, no mutation.

Table 3. MICs for and ribosomal mutations observed in *L. pneumophila* mutants selected with erythromycin and azithromycin and in *L. pneumophila* *ΔdotA* erythromycin-selected transformants.

Strain	MIC (mg/L)										Nucleotidic and amino acid changes		
	ERY	AZI	CLR	SPI ^a	LZ	LVX	CIP	RIF	23S rRNA ^b (no. of mutated copies)				
Ery 1	1024	2048	256	100000	16	0.032	0.016	0.0005	G2057A (3/3) + A2059C (3/3)			G66D	-
Ery 2	1024	128	128	6250	16	0.032	0.016	0.0005	C2611G (3/3)			Q62R + G64E	-
Ery 3	1024	32	256	6250	32	0.032	0.016	0.0005	C2611T (3/3)			G66A	-
Ery 4	1024	1024	256	100000	8	0.032	0.016	0.0005	A2058T (2/3)			G66A	K90M
Ery 5	2048	2048	>256	100000	8	0.032	0.016	0.0005	A2058C (2/3) + A2059G (1/3)			G66A	-
Ery 6	1024	64	64	6250	32	0.032	0.016	0.0005	C2611T (3/3)			G66D	-
Azi 1	1024	256	256	25000	32	0.032	0.016	0.0005	C2611T (3/3)			G66R + T65K	G91D
Azi 2	1024	2048	512	12500	16	0.032	0.016	0.0005	A2058G (3/3)			G66D	-
Azi 3	2048	256	256	25000	32	0.032	0.016	0.0005	C2611T (3/3)			T65K + G66C	-
Azi 4	2048	256	512	25000	32	0.032	0.016	0.0005	C2611G (3/3)			del ⁶³ KG ⁶⁴	-
Azi 5	1024	1024	256	25000	16	0.032	0.016	0.0005	A2058G (3/3)			T65K	P87L + G91D
Azi 6	2048	2048	512	12500	16	0.032	0.016	0.0005	A2058G (3/3)			-	-
<i>ΔdotA</i> L1	≥1024	1024	256	6250	ND	ND	ND	ND	A2058G (3/3)			-	-
<i>ΔdotA</i> L2	≥1024	1024	32	6250	ND	ND	ND	ND	A2058G (2/3)			-	-
<i>ΔdotA</i> L3	16	32	4	780	ND	ND	ND	ND	G2057T (3/3)			-	-
<i>ΔdotA</i> L4	4	2	0.5	1560	ND	ND	ND	ND	-			G66R	-
<i>ΔdotA</i> L6	256	8	4	1560	ND	ND	ND	ND	C2611T (2/3)			-	-
<i>ΔdotA</i> L7	128	8	4	780	ND	ND	ND	ND	C2611T (2/3)			-	-
<i>ΔdotA</i> L8	64	2	0.5	390	ND	ND	ND	ND	-			G66A	-
<i>ΔdotA</i> L9	8	4	<0.125	1560	ND	ND	ND	ND	-			G66R	-
<i>ΔdotA</i> L10	4	2	<0.125	780	ND	ND	ND	ND	-			G66A	-
Paris WT	0.25	0.25	<0.125	195	16	0.032	0.016	0.0005	-			-	-
<i>ΔdotA</i>	0.25	0.25	<0.125	195	16	0.032	0.016	0.0005	-			-	-

^a except spiramycin (IU/mL); ^b *E. coli* numbering; ND, Not determined; -, no mutation.

ERY, erythromycin; AZI, azithromycin; CLR, clarithromycin; SPI, spiramycin; LZ, linezolid; LVX, levofloxacin; CIP, ciprofloxacin; RIF, rifampicin.

Materials and methods

Bacterial strains and culture media

The reference strain *L. pneumophila* serogroup 1 Paris (CIP 107629T) was used to select for macrolide-resistant strains. Bacteria were grown in N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-buffered yeast extract (BYE) broth at 37°C without agitation in an aerobic atmosphere or on buffered-charcoal-yeast extract (BCYE) agar plates (Oxoid, Dardilly, France) at 35°C in a 2.5% CO₂-enriched atmosphere. The cultures were performed in a biosafety level 3 laboratory. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 strains were used as controls for antibiotic concentrations by MICs determination in Mueller-Hinton broth (AES, Combourg, France).

The strain *L. pneumophila* serogroup 1 Paris deleted for *dotA* by a unique insertion of a kanamycin cassette (*dotA::kan*) was used to select for macrolide-resistant strains by natural transformation in a biosafety level 2 laboratory. The DotA protein is related to virulence in *L. pneumophila* and the deletion of *dotA* induces an avirulent phenotype, which allows experimentations in a biosafety level 2 laboratory.

The BCYE plates containing 50 mg/mL of erythromycin (final concentration: 5 mg/mL because of charcoal absorption) were also prepared to select macrolide-resistant $\Delta dotA$ transformants.

Antibiotics

The following antimicrobial agents were tested: erythromycin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), azithromycin (Sigma-Aldrich), clarithromycin (Sigma-Aldrich), spiramycin (Sanofi-Aventis, Paris, France), linezolid (Pfizer, Amboise, France), levofloxacin (Sanofi-Aventis), ciprofloxacin (Bayer, Puteaux, France), rifampicin (Sigma-Aldrich), doxycycline (Sigma-Aldrich). Antibiotic solutions were prepared according to the manufacturers recommendations as 64 mg/mL and stored at - 20°C until use.

Selection of macrolide-resistant mutants of *L. pneumophila*

Selection of six independent erythromycin-resistant lineages (Ery1 – Ery6) and six independent azithromycin-resistant lineages (Azi1 – Azi6) was performed by serial passages in BYE medium containing increasing sub-inhibitory concentrations of erythromycin or azithromycin. For the first passage, the reference strain *L. pneumophila* serogroup 1 Paris was grown on a BCYE plate incubated for 3 days in a 2.5% CO₂-enriched atmosphere at 35°C. A suspension in BYE broth containing 5.10⁵ CFU/mL was dispensed in 24-well microtitre plates (BD Falcon™, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) at 0.8 mL per well. Erythromycin or azithromycin (0.2 mL per well) was added with increasing two-fold

concentrations ranging from 0.5- to 16-fold the MIC determined for the ancestral strain (0.5 mg/L). To avoid a contamination across lineages, only two lineages were propagated by microtitre plate, the cultures being separated by empty wells. The plates were incubated for 3 – 4 days in a 2.5% CO₂-enriched atmosphere at 35°C. The MIC was determined as the lowest antibiotic concentration that inhibited visible bacterial growth. It was recorded as the MIC of the first selection passage. The culture containing the highest concentration of antimicrobial agent with bacterial growth was used to propagate the lineages, after a 1:100 dilution, by a following passage into new 24-well microtitres plates containing fresh medium, with, again, increasing two-fold concentrations ranging from 0.5- to 16-fold the MIC determined for the previous selection cycle. This procedure was repeated until growth was obtained at an erythromycin (Ery1 – Ery6) or azithromycin (Azi1 – Azi6) concentration of 1024 mg/L, which corresponded to a 4096-fold increase in antibiotic MIC for the ancestral strain or until 20 passages. Three consecutive passages were realized in a 0.5-fold MIC medium to assess the stability of genotype before stopping the evolution procedure. At each step, the genetically heterogeneous mixed samples from each lineage was frozen at - 80°C.

PCR Amplification and sequencing of the genes encoding the 23S rRNA and the L4 and L22 ribosomal proteins

The bacterial frozen suspensions from each of the twelve lineages sampled at the last step were plated onto BCYE agar plates. Genomic DNA was extracted from of a mixture of the evolved clones using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacture's instructions.

Specific oligonucleotide primers pairs for the three copies of gene encoding 23S rRNA domain V and for the L4 and L22 ribosomal proteins were design from the complete genome sequence and are described in Table 1. The same forward primer (F2) was used to amplify the *rrn* gene due to the high homology between each copy of the 23S rRNA genes, and a specific reverse primer located after the 5S rRNA-encoding gene (R1.3, R2''2, R3.2) was designed for each copy, in order to determine the number of mutated genes in macrolide-resistant strains. Another primers pair (23SF, 23R) was used for the sequencing of the 23S rRNA regions revealing mutations. Two primers pairs were used for *rplD* and *rplV* amplification and sequencing.

Briefly, all PCRs were performed using Expand High FidelityPLUS Taq polymerase (Roche Diagnostics, Meylan, France) and were carried out in 50 µL volumes containing 0.4 µM concentration of each primer and 1 or 10 µL of DNA according to the PCR (*rrn* or *rplD/rplV* respectively). Amplification was achieved as described in Table 1. The PCR products were checked by SYBR Safe - supplemented agarose gel electrophoresis (Invitrogen, Illkirch, France). DNA double strain sequencing was performed by the dye terminator method with

the BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) on a 3730xl sequencer (Applied Biosystems). Sequence alignments were performed using 3730xl software.

The dynamic of mutations involved in macrolide-resistant strains was determined retrospectively from the frozen intermediate bacterial mixtures.

Reconstruction of resistance mutations in the ancestral strain

The involvement of *rrn*, *rpID* and *rpIV* mutations in macrolide resistance was confirmed by reconstruction by induction of competence for natural transformation in $\Delta dotA$ *L. pneumophila* strains as described by Buchrieser *et al.*. The bacterial mixtures were plated on BCYE agar containing 50 mg/mL of erythromycin that were examined until 21 days.

Reference:

Buchrieser, C. and X. Charpentier, *Induction of competence for natural transformation in Legionella pneumophila and exploitation for mutant construction*. Methods Mol Biol, 2013. **954**: p. 183-95.

6 Conclusion, discussion et perspectives

Au cours de ce travail, la pluralité des facteurs susceptibles de contribuer aux échecs thérapeutiques, facteurs à la fois liés à l'hôte (facteurs de risque, statut immunitaire, complications) et au pathogène (virulence et résistance) ont été évoqués.

Le cas clinique que nous avons décrit illustre l'importance de rechercher des facteurs de risque individuels et d'éventuelles complications pulmonaires parallèlement à l'exploration de la sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques. Nous avons montré que la PCR *Legionella* quantitative en temps réel pouvait constituer un outil de détection et de suivi des échecs thérapeutiques. Nous avons ensuite exploré deux mécanismes susceptibles de contribuer à la sévérité des légionelloses : l'existence d'un antagonisme entre les macrolides, la rifampicine et/ou les fluoroquinolones et l'apparition de mécanismes de résistance aux macrolides sous antibiothérapie.

La PCR constitue en France un critère de définition des cas probables de légionellose depuis 2011. Réalisée sur des prélèvements respiratoires, elle montre une sensibilité supérieure à la culture mais inférieure aux tests détectant l'antigène urinaire lorsque les cas sont sélectionnés sur la base d'une antigénurie positive [177-179]. Effectuée en seconde intention lorsque l'antigénurie est négative, la PCR permet de diagnostiquer des cas de légionellose ayant échappé aux tests urinaires. L'étude récente de Murdoch *et al.* réalisée en Nouvelle-Zélande montre que le nombre de cas de légionellose est multiplié par quatre lorsque les PCR sont réalisées sans demande spécifique sur les prélèvements respiratoires de patients hospitalisés pour pneumopathie [438]. Bien qu'elle présente un biais pour être transposée en France (*L. longbeachae* et *L. pneumophila* étant responsables à parts égales des cas de légionellose en Nouvelle-Zélande [26]), cette étude suggère une probable sous-estimation du nombre de cas diagnostiqués en France et démontre l'apport des PCR en systématique dans une population ciblée.

Déterminée à l'admission du patient, la concentration d'ADN dans les prélèvements pulmonaires est corrélée à la sévérité de la légionellose, à l'admission en réanimation et à la durée d'hospitalisation, ce qui suggère l'intérêt de la PCR quantitative comme marqueur diagnostique et pronostique dans les légionelloses [181]. La concentration d'ADN semble varier en fonction de la nature du prélèvement pulmonaire. En effet, la solution saline injectée pour la réalisation des LBA dilue les prélèvements pulmonaires. Chez des patients prélevés itérativement, la charge bactérienne contenue dans les LBA est inférieure d'au moins 2 log à celle présente dans les aspirations trachéales et les expectorations [181]. Ce

point limitant est à investiguer puisqu'il imposerait de standardiser la nature et/ou la réalisation des prélèvements respiratoires.

De rares données existent sur l'apport de la PCR sur prélèvements pulmonaires dans le suivi des patients sous antibiothérapie et dans la détection des complications. Korosec *et al.* ont montré pour trois cas que la PCR se négativait dans les prélèvements respiratoires dans les 4 à 6 jours suivant l'initiation de l'antibiothérapie [182]. Le cas clinique que nous avons décrit montre que la PCR quantitative en temps réel permet d'identifier plus précocement que la culture les patients en échec thérapeutique.

La suite de notre travail a été consacrée à l'étude des mécanismes de résistance aux macrolides chez *Legionella*. En l'absence de mutants résistants décrits jusqu'à présent, l'indication d'une bi-antibiothérapie devrait être fondée sur l'obtention d'une synergie entre antibiotiques. Cependant, aucun consensus en faveur d'une synergie n'émerge des études des associations d'antibiotiques *in vitro* sur *Legionella*. Les données de la littérature sont difficilement interprétables pour plusieurs motifs. *Legionella* étant une bactérie intracellulaire, la pertinence des études extracellulaires doit être remise en question. En effet, les techniques extracellulaires ne considèrent pas la pénétration des antibiotiques dans les cellules infectées, leur diffusion jusqu'au phagosome, leur potentielle inactivation ou séquestration dans un compartiment autre et l'environnement au sein du phagosome (notamment le pH). Les limites de ces méthodes sont démontrées par les études évaluant l'activité anti-*Legionella* des β -lactamines : leur excellente activité extracellulaire à des CMI de l'ordre du mg/L [240, 247, 248] contraste avec les observations cliniques rapportant qu'un échec d'antibiothérapie préalable par β -lactamines est évocateur d'une légionellose [78].

Les méthodes intracellulaires semblent ainsi plus adaptées à l'étude de l'activité des antibiotiques sur *Legionella*. La littérature recense trois études des associations par méthode intracellulaire, toutes réalisées sur des monocytes de donneurs humains [249, 252, 270]. Dans l'étude de Baltch *et al.* [252], les associations lévofloxacine – érythromycine, lévofloxacine – rifampicine et érythromycine – rifampicine ont été évaluées sans détermination préalable des CMIE et à des concentrations d'antibiotiques égales à 10 fois la CMI. Sur la base des résultats de notre travail, ces concentrations sont supérieures aux CMIE et donc non adaptées à la recherche d'une synergie [439]. Par ailleurs, il s'agit d'une étude cinétique de bactéricidie. La seconde étude d'Havlichek *et al.* a été réalisée sur une souche de *L. pneumophila* différente et présente exactement les mêmes biais que la précédente [270]. Il est cependant montré que l'association ciprofloxacine – rifampicine présente une bactéricidie inférieure à celle observée lorsque les molécules sont testées seules, ce qui laisse suspecter un antagonisme. Cependant, la méthodologie utilisée n'étant pas la technique de l'échiquier, ces résultats restent à interpréter avec précaution. Seule

l'étude de Vildé *et al.* propose une méthodologie adaptée à la détermination de l'activité intracellulaire de la rifampicine, de l'érythromycine, de la péfloxacine et de leurs associations [269]. Un effet additif est observé pour les associations érythromycine – rifampicine et érythromycine – péfloxacine, et une indifférence pour l'association péfloxacine – rifampicine. A notre connaissance, il s'agit de la seule étude permettant de conclure quant à l'effet des associations d'antibiotiques sur *Legionella in vitro*. Aucune synergie ni aucun antagonisme n'ont été démontrés.

Notre hypothèse étant qu'un antagonisme entre antibiotiques pourrait contribuer aux échecs thérapeutiques, nous avons donc procédé à une étude similaire. Nous avons travaillé sur la lignée monocyttaire U-937 qui permet de s'affranchir des variabilités inter-individuelles pouvant être observées avec des cellules de donneurs. A l'inverse de ce qui était suspecté, nous avons identifié une synergie modeste entre les macrolides et la rifampicine, avec un index FIC à 0,5 [439]. L'étude de Vildé *et al.* avait montré un index FIC quasi-identique (à 0,6) pour cette association qui ne permettait de conclure qu'à un effet additif. La nature des cellules monocytaires, la souche de *L. pneumophila* utilisée et la méthode de quantification suffisent probablement à expliquer ces différences.

Parallèlement, l'étude clinique récente de Rello *et al.* a montré la supériorité d'une bithérapie par clarithromycine – rifampicine sur une monothérapie par clarithromycine en terme de mortalité, qui converge avec nos résultats *in vitro* [279]. Il convient cependant d'interpréter ces données avec précaution en raison du nombre faible de patients inclus dans l'étude (25 patients). Par ailleurs, l'étude antérieure de Benito *et al.* (97 patients) ne montrait pas de différence entre mono- et bi-antibiothérapie en terme de mortalité et de complications [277]. Enfin, l'étude de Grau *et al.*, bien que limitée à 21 patients, mettait en garde contre la iatrogénie de l'association macrolides – rifampicine, ce qui nous conduit à être prudents quant à la recommandation de cette bithérapie [276].

Malgré l'évolution des connaissances sur *Legionella* depuis sa découverte en 1976, la sensibilité des méthodes culturales reste faible. Les milieux BCYE, puis les milieux semi-sélectifs GVPC, BMPA et MWY ont été développés par Edelstein *et al.* et Wadowsky et Yee [152, 153, 440]. Depuis 1981, aucune amélioration n'a été apportée à ces milieux pré-existants. Un isolat clinique n'est disponible que dans 24% des cas diagnostiqués en France en 2012. Ce faible pourcentage est en lien direct avec la réalisation de la culture sur un nombre restreint de cas mais également avec la faible sensibilité de cette méthode (estimée à 52,5% pour les cas confirmés de légionellose au CNR). Par ailleurs, l'isolement des colonies nécessite un délai minimal de 4 jours tandis que les méthodes de détection d'antigènes urinaires sont rapides et présentent une excellente spécificité, ce qui n'incite pas les cliniciens à réaliser des prélèvements respiratoires pour l'isolement des souches.

Cet isolement est pourtant indispensable à la réalisation d'un antibiogramme. La nature du milieu joue vraisemblablement un rôle important dans la sensibilité de la culture. Cependant, nous n'avons retrouvé aucune étude comparant les performances des milieux commercialisés. Nous avons montré que les milieux BMPA et MWY présentaient une meilleure sensibilité que les milieux GVPC et BCYE. Ces résultats étaient concordants avec les travaux d'Edelstein *et al.* sur des prélèvements d'eau potable qui montraient la supériorité des milieux BMPA et MWY sur le milieu BCYE [441]. Les moins bonnes performances du milieu GVPC ne sont pas retrouvées dans la littérature [442-444]. La nature du prélèvement (clinique ou environnemental) contribue probablement aux différences observées. En effet, la polymyxine contenue dans le milieu GVPC est active sur les bacilles à Gram négatif présents dans l'eau comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *E. coli*, tandis que l'anisomycine contenue dans les milieux BMPA et MWY est un inhibiteur fongique actif sur les levures présentes dans la flore oro-pharyngée.

Parallèlement, nous avons évalué la technique de co-culture amibienne avec des amibes du genre *Acanthamoeba*. L'apport de la co-culture amibienne dans l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements cliniques avait été décrit ponctuellement [166-168]. En particulier, un isolement de *Legionella* à partir de selles rapporté par Rowbotham suggérait la capacité de décontamination bactérienne du prélèvement par les amibes [166]. Notre étude a montré qu'en effet, la co-culture amibienne permettait d'isoler davantage de souches cliniques, en particulier lorsque la culture était fortement contaminée [170]. Cependant, pratiquée isolément, elle présentait une sensibilité inférieure à la culture : 34 *versus* 42%. Les travaux récents de Conza *et al.* à partir de prélèvements de compost ont montré des résultats superposables : la sensibilité de la co-culture était inférieure à celle de la culture pour les composts, tandis qu'elle était supérieure dans des prélèvements « pauvres » en micro-organismes (air et prélèvements de compost stérilisés puis surchargés en légionelles) [445]. Ces données suggèrent qu'au-delà d'un certain seuil de contamination, la présence d'autres micro-organismes pourrait interférer avec la croissance des légionelles.

L'ajout d'antibiotiques inactifs sur *Legionella* dans le milieu PAS utilisé pour la co-culture amibienne (par exemple une association pénicilline G – streptomycine à 1%) pourrait constituer une première piste d'amélioration de la technique.

Une technique en milieu solide, l'*Amoebae Plate test* (APT), initialement développée par Albers *et al.* pour comparer la croissance intracellulaire de différentes souches de *Legionella*, pourrait également constituer une piste d'amélioration [446]. Les amibes *Acanthamoeba castellanii* sont réparties sur une gélose BCYE et les suspensions bactériennes sont ensuite déposées en spots sur le tapis amibien. Si une multiplication intra-amibienne se déroule, les amibes sont lysées et les légionelles peuvent cultiver sur la gélose. A l'inverse, en l'absence d'infection et/ou de multiplication intra-amibienne, les

légionelles ne peuvent atteindre le milieu gélosé qui reste stérile. L'application de cette technique d'APT directement à partir de prélèvements respiratoires pourrait constituer une alternative à la co-culture en milieu liquide pratiquée actuellement en combinant l'effet décontaminant des milieux MWY et BMPA à celui des amibes.

Jusqu'à présent, le CNR ne réalise pas d'antibiogramme sur tous les isolats cliniques. Cette indication est réservée aux patients en échec thérapeutique pour lesquels une résistance est suspectée. Une approche systématique pourrait permettre la détection d'éventuels mutants résistants. Chez *Bordetella pertussis*, considérée comme constamment sensible aux macrolides, ce type d'approche a permis la détection de la première souche résistante en France (voir annexe à la discussion) [352]. Une communication affichée de Bruin *et al.* à l'occasion du congrès *Legionella* 2013 (Melbourne) décrirait une souche clinique de *Legionella pneumophila* résistante aux fluoroquinolones (mutation dans le gène *gyrA*) mais ces données ne sont pas publiées au moment de l'écriture du présent manuscrit [447].

Il n'existe pour l'instant aucune technique de référence, et de ce fait aucune valeur critique de CMI permettant de définir la résistance d'une souche aux antibiotiques. En 2012, Bruin *et al.* ont déterminé les sensibilités aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine de 183 souches cliniques de *L. pneumophila* séro groupe 1 par des bandelettes E-test sur gélose BCYE. Sur la base de la distribution des CMI obtenues, des valeurs critiques permettant de détecter les légionelles résistantes pourraient être établies. Cependant, les CMI sont élevées en raison du charbon contenu dans le milieu [216]. La valeur de la CMI doit donc être interprétée avec précaution et ne peut pas être directement corrélée aux concentrations *in vivo*. Les valeurs critiques cliniques restent donc à définir.

La culture de *Legionella* étant négative dans de nombreux cas, il apparaît nécessaire de développer des outils moléculaires permettant la détection de la résistance directement à partir de prélèvements respiratoires. A la différence des fluoroquinolones et de la rifampicine, les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *Legionella* aux macrolides sont méconnus [4, 5]. Notre travail a donc consisté dans un premier temps à générer des lignées de mutants hautement résistants aux macrolides. Cette sélection a été réalisée à partir de la souche endémique Paris par deux antibiotiques, l'érythromycine et l'azithromycine, qui sont respectivement les macrolides « historique » et « de référence » dans l'antibiothérapie des légionelloses.

Sur les douze lignées sélectionnées, nous avons identifié des mutations « attendues » (car déjà décrites pour d'autres genres bactériens) sur la cible ribosomale (ARNr 23S et protéines L4 et L22). Les mutants résistants à l'érythromycine ont été

sélectionnés plus facilement que les mutants résistants à l'azithromycine en terme de niveau de résistance et de nombre de passages.

Chronologiquement, les premières mutations affectent le plus souvent les protéines ribosomales L4 et L22 et sont associées à un faible niveau de résistance. Les substitutions sur les gènes codant l'ARNr 23S portent sur le domaine V (centre peptidyl-transférase) : nucléotides 2051 à 2053, cytosine 2605 (respectivement 2057 à 2059 et 2611 selon la numérotation d'*E. coli*) et sont associées à un niveau de résistance égal ou supérieur : niveau de résistance faible à modéré pour les mutations sur le nucléotide 2057, intermédiaire à élevé pour le nucléotide 2611 et élevé pour les adénines 2058 et 2059.

Le niveau de résistance est également corrélé au nombre de copies d'ARNr 23S mutées. Des données identiques ont été montrées pour les mutations en position 2057 chez *Francisella* [338]. Pour la position 2058, nos résultats contrastent avec les données de la littérature. En effet, pour les bactéries des genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Francisella*, *Bordetella* et *Ureaplasma*, un haut niveau de résistance est acquis quel que soit le nombre de copies mutées [328, 338, 350, 371, 373]. Enfin, pour la position 2059, les données de la littérature varient au sein d'une même espèce [330, 341].

Comme pour *N. gonorrhoeae*, les substitutions en position 2611 sont associées à haut niveau de résistance à l'érythromycine (CMI = 1024 mg/L) tandis que le niveau de résistance à l'azithromycine est inférieur (CMI = 256 mg/L) [379]. Il apparaît intéressant de déterminer les CMI des kétolidés sur ces mutants résistants puisque les mutations en position 2059 ne sont pas associées à une résistance aux kétolidés chez *U. parvum* et *S. pneumoniae* [339, 341].

Enfin, la nature de la substitution en position 2611 modifie le niveau de résistance, les substitutions C2611A étant associées à un niveau de résistance inférieur à celui induit par les substitutions C2611T/G comme cela a été observé chez *S. pneumoniae* et *M. pneumoniae* (avec l'érythromycine) [337, 448].

Il existe cependant deux principaux biais à notre étude. Le premier est que nous n'avons étudié qu'un seul fond génétique, la souche Paris. Il serait intéressant de sélectionner d'autres souches de *L. pneumophila* et d'autres espèces afin d'élargir nos résultats. Par ailleurs, nous avons étudié des populations bactériennes globales. Seules l'identification des mutations colonie par colonie ou l'utilisation de techniques d'*ultra-deep sequencing* pourraient nous permettre d'évaluer plus finement ces populations de mutants résistants.

La facilité d'obtention de mutants résistants *in vitro* justifie une recherche systématique de cette résistance sur des prélèvements cliniques. Notre objectif est désormais de définir son incidence à partir de prélèvements cliniques.

Sur la base de ces résultats, nous avons commencé à mettre au point une PCR permettant la détection des mutations sur les gènes *rrn* codant l'ARNr 23S. Il s'agit d'une PCR biplex en temps réel utilisant des sondes *sloppy molecular beacons*, qui cible les deux régions pour lesquelles nous avons observé des mutations (région 2057-2059 et région 2611). Cette PCR a d'abord été mise au point sur les douze mutants résistants et nous avons observé un décalage de la température de fusion (T_m) de 3°C minimum par rapport à la souche sauvage. Elle a ensuite été évaluée sur 74 souches de référence de *Legionella pneumophila* sérogroupes 1 à 15 et *Legionella non pneumophila*, puis sur 561 isolats cliniques et environnementaux. Aucun décalage de T_m n'a été observé sur ces isolats ce qui suggère que l'incidence de la résistance aux macrolides est très faible. La spécificité de cette PCR a été déterminée sur 125 prélèvements respiratoires pour lesquels la PCR et/ou la culture de *Legionella* était(en)t négative(s). Nous avons observé un décalage de T_m pour 6 prélèvements sur les 125 (région 2057-2059), ce qui définit une spécificité de 95%. Le séquençage de ces produits de PCR a montré que les séquences amplifiées étaient homologues à des séquences d'entérobactéries. Une amélioration de cette PCR par une modification des amorces est en cours. Cette PCR sera ensuite appliquée de façon prospective et systématique sur tous les prélèvements adressés au CNR pour expertise dès lors que le diagnostic de légionellose est établi.

La poursuite de ce travail portera sur les autres données du séquençage du génome total des douze lignées résistantes aux macrolides.

Des mutations sur les gènes codant les protéines L3 et S19 ont également été identifiées pour deux lignées. Parmi les protéines ribosomales, la protéine L3 est la plus proche du centre peptidyl-transférase. Les mutations affectant la protéine L3 ont été décrites chez *Bradyspira* et *E. coli* comme associées à une résistance à la tiamuline, un apparenté aux macrolides qui agit en se liant au centre peptidyl-transférase et en inhibant la synthèse protéique de façon directe [449, 450]. Elles ont également été identifiées chez des staphylocoques résistants au linézolide [451, 452]. Les mutations décrites dans la littérature portent sur les acides aminés les plus proches du centre peptidyl-transférase (acide aminés 125 à 161) [453]. Dans la lignée « Azi 2 », nous avons observé une transition R140I, mais la CMI du linézolide n'était pas augmentée. L'impact de la mutation sur le niveau de résistance pourrait être masqué par les mutations sur l'ARNr 23S présentes dans la lignée. Il sera donc nécessaire de déterminer la chronologie d'apparition de cette mutation afin de définir son éventuelle contribution dans la résistance aux macrolides. La reconstruction de la mutation

dans une souche sensible pourrait nous permettre d'étudier son rôle dans la résistance aux macrolides.

En l'absence de données sur la protéine S19 dans la littérature, une démarche identique pourrait être adoptée.

Pour deux lignées sélectionnées par azithromycine (Azi 1 et Azi 3), nous avons observé des mutations en amont de la séquence codant la protéine Lpp2879 (homologue à AcrA) exprimée en opéron avec Lpp2880 (homologue à AcrB). AcrA est une protéine périplasmique qui s'associe à la protéine de la membrane interne homologue à AcrB, et à la protéine transmembranaire TolC pour former une pompe à efflux de la famille RND (*Resistance / Nodulation / Division*) chez *E. coli*. La protéine TolC est retrouvée chez toutes les bactéries à Gram négatif. Chez *Legionella*, dans un autre fond génétique (souche épidémique Lens), Ferhat *et al.* ont montré qu'elle jouait un rôle dans la multi-résistance aux antibiotiques, antiseptiques et colorants [454]. Les mutants $\Delta tolC$ présentaient une CMI à l'érythromycine multipliée par 16, les CMI de l'acide nalidixique et de la doxycycline étant inchangées [454]. De la même façon, une mutation impactant la protéine Lpp2879 pourrait jouer un rôle dans l'efflux des macrolides. Pour la lignée Azi 1, une substitution est observée 7 pb avant le site d'initiation de la transcription, donc peut être dans le promoteur du gène *lpp2879*. Pour la lignée Azi 3, deux substitutions sont observées dans la région comprise entre le site d'initiation de la transcription (+17 et 18 pb) et le début de la séquence codante (-8 et 9 pb), région qui pourrait correspondre au site de liaison du ribosome (*ribosome binding site* ou RBS). Ces mutations potentiellement sur le promoteur et le RBS pourraient être responsables d'une surexpression des protéines Lpp2879/Lpp2880 (gènes organisés en opérons) et donc d'une résistance par efflux, la protéine TolC n'étant pas limitante étant donné qu'elle est retrouvée dans plusieurs pompes à efflux.

Pour tester notre hypothèse, nous avons d'abord réalisé une expression hétérologue de lpp2879-lpp2880 dans *E. coli* afin de déterminer le rôle de ces protéines dans l'efflux. Les séquences codantes de lpp2879 et lpp2880 de *L. pneumophila* ont été clonées dans un plasmide inductible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) dans *E. coli* délétée pour les gènes *acrA* et *acrB*. L'induction n'a pas majoré la CMI de l'érythromycine. Cependant, *E. coli* possède de nombreuses pompes à efflux TolC dépendantes et il est possible que l'induction ait été masquée par ces autres pompes. De plus, il est possible qu'une pompe à efflux hétérologue (protéines Lpp2879 et Lpp2880 de *L. pneumophila* et protéine TolC d'*E. coli*) ne soit pas fonctionnelle.

D'autres approches complémentaires seront réalisées afin de déterminer le rôle des mutations observées dans la résistance aux macrolides. Nous réaliserons une fusion traductionnelle entre les séquences mutées en amont de *lpp2879* et un gène rapporteur

(β -galactosidase). Une autre approche consistera à comparer les CMI des macrolides de ces deux lignées en présence ou en absence d'un inhibiteur de pompe à efflux proton-motrice comme par exemple le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone). Sur un plan technique, cette seconde stratégie nécessite une reprise des expérimentations en laboratoire de confinement L3.

D'autres mutations identifiées par le séquençage du génome total des lignées sont à explorer. En particulier, des mutations identifiées dans des lignées indépendantes qui affectent des gènes codant des protéines de membrane (*lpp3032* – 2 lignées), des transporteurs phosphate (*lpp0633* – 3 lignées) et une protéine de fonction inconnue (*lpp0836* – 4 lignées). Leur implication dans le mécanisme de résistance reste à étudier par une approche par délétion – complémentation.

Enfin, pour trois lignées, nous avons observé des mutations dans la séquence codante ou en amont (entre le site d'initiation de la transcription et le RBS) du gène *fis* présent en trois copies chez *L. pneumophila*. La protéine Fis est un régulateur global de la transcription. Un de ses rôles essentiels est d'activer la transcription de gènes codant les ARN stables (ARN de transfert et ribosomaux) en début de phase exponentielle de croissance [455]. Cette protéine est impliquée dans l'expression de facteurs de virulence chez de nombreux genres bactériens [456-459]. Chez *E. coli*, il a été montré qu'elle jouait un rôle dans la « persistance » ou dormance bactérienne et dans la tolérance aux antibiotiques [460]. De ce fait, les mutations identifiées dans et/ou en amont de deux des gènes *fis* pourraient présenter un rôle dans la virulence des légionelles résistantes ou plus directement dans leur résistance aux macrolides.

Les résultats du séquençage offrent ainsi de nombreuses perspectives sur les mécanismes de résistance et d'éventuelles mutations « compensatrices » qui pourraient permettre à la bactérie de conserver sa virulence et son *fitness* malgré le coût énergétique induit par la résistance.

Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Infection in Newborn Girl, France

Sophie Guillot, Ghislaine Descours, Yves Gillet, Jérôme Etienne, Daniel Floret, and Nicole Guiso

A macrolide antimicrobial drug was administered to a newborn with cough. On day 23 of hospitalization, macrolide-resistant *Bordetella pertussis* was isolated from nasopharyngeal aspirates. DNA sequencing and PCR–restriction fragment length polymorphism showed a 2047 A-to-G mutation in the 3 copies of the 23S rRNA gene. Monitoring for macrolide resistance is essential in infants <6 months of age.

Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough, continues to circulate among children and adolescents even in regions with high vaccine coverage. Antimicrobial drug treatment contributes substantially to controlling transmission of the disease. In France, the treatment of choice is clarithromycin or azithromycin, which eliminate the bacterium from the respiratory tract of the infected patient and their close contacts (1). To date, erythromycin resistance in *B. pertussis* has been described only in the United States (2–4). The erythromycin-resistant *B. pertussis* isolates in the United States carry an A-to-G transition at nucleotide position 2047 of the 23S rRNA gene, in a region critical for erythromycin binding.

The Study

We report the case of an 18-day-old girl, born without complication after 39 weeks of pregnancy, weighing 3,510 g. She was brought to the emergency department of Hôpital Femme Mère Enfant (Lyon, France) with a 2-day history of cough without fever and worsening status. She had not previously been ill. The mother reported a cough that had persisted for 2 weeks. Physical examination found no fever, a heart rate of 169 beats/min, a respiratory rate of 60 breaths/min, signs of retraction, and an oxygen saturation of 92% in room air. Lung examination found rales in both

basal fields, with a loose cough. The leukocyte count was 26.8 cells/mm³, with 51% lymphocytes. Venous blood gas measurement showed a pH of 7.30, a carbon dioxide partial pressure of 7.19 kPa, and a partial oxygen pressure of 4.14 kPa. Chest radiograph showed thoracic distension without signs of condensation. Nasopharyngeal aspirates were positive for *B. pertussis* by culture and specific PCR (Cepheid, Maurens-Scopont, France).

The patient was admitted to the intermediate care unit and was given azithromycin for 3 days, but her condition worsened (respiratory rate of 90–100 breaths/min, transient episodes of bradycardia at 75–100 beats/min). She was referred to the pediatric intensive care unit (ICU) 4 days after admission. On day 5, the patient underwent a 300-mL volume exchange transfusion because of increasing oxygen requirement, despite continuous positive airway pressure (fraction of inspired oxygen 50%) and increased leukocyte count (64 cells/mm³). The postexchange leukocyte count fell to 20 cells/mm³, but the respiratory benefit was only moderate. On day 14, the leukocyte count had increased to 54 cells/mm³, and the oxygen requirement to fraction of inspired oxygen 40%; a second 300-mL volume exchange transfusion was administered. A second sample of nasopharyngeal aspirates was obtained and was positive for *B. pertussis* by culture and specific PCR. Clarithromycin treatment was started on day 18 and continued for 7 days.

The patient started to improve after 23 days and was transferred from the ICU to the pulmonary unit on day 35. A routine nasopharyngeal aspirate was taken, and an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* was cultured from this aspirate (10⁵ CFU/mL); cotrimoxazole was then administered for 8 days. The patient recovered normal pulmonary function and was discharged on day 44. Cultures of the sample taken at discharge showed a single colony of *B. pertussis*, and clarithromycin was administered for 5 days. The patient recovered completely, and results of *B. pertussis*–specific culture and PCR with nasopharyngeal aspirates were negative for *B. pertussis* on day 98.

Three isolates were collected, one at admission (FR4929), one 18 days after azithromycin treatment (FR4930) and a third 19 days after clarithromycin treatment (FR4991). FR4929 and FR4930 were sensitive to all macrolides tested (erythromycin, clarithromycin, azithromycin), but FR4991 was resistant. The Etest MIC was >256 µg/mL for all macrolides. To our knowledge, macrolide resistance has not been found in other *B. pertussis* isolates collected in France since the late 1940s.

The 3 isolates and the erythromycin-resistant isolate A228 (2) from the United States were analyzed for biochemical characters and by pulsed-field gel electrophoresis, genotyping and expression of virulence as described in Bouchez et al. (5). The 3 isolates from France belong to the same group (group IV) as that of all

Author affiliations: Institut Pasteur, Paris, France (S. Guillot, N. Guiso); Hospices Civils de Lyon, Bron, France (G. Descours, J. Etienne, Y. Gillet, D. Floret); and University Claude Bernard, Lyon, France (G. Descours, J. Etienne, D. Floret)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1806.120091>

B. pertussis isolates circulating in France since 1998 and A228. They all harbor a *PtxP3* allele, a *PtxA* allele, and a *prn 2* allele, and expressed all tested virulence factors: pertussis toxin, adenylate cyclase–hemolysin, filamentous hemagglutinin, pertactin, and fimbrial protein type 3.

PCR amplification and DNA sequencing were used to determine whether the resistance to erythromycin was associated with a mutation in the 23S rRNA gene as described by Bartkus et al. (2). The sequences of ≈ 400 nt of the 521-bp PCR fragment were determined for the 3 isolates obtained from this patient, A228 (2), and the reference strain Tohama (6). An A-to-G mutation was found at position 2047 in the 23S rRNA gene in the genomes of FR4991 and A228 but not in the genomes of FR4929 and FR4930.

B. pertussis carries 3 copies of the 23S rRNA gene. To test whether all 3 copies were mutated, DNA amplified by PCR (which amplified the sequences of all 3 copies of the 23srRNA) from each isolate was digested with *BbsI*: the A2047G transition in the rRNA gene is predicted to create a *BbsI* restriction site (Figure). *BbsI* cleaved the entire DNA amplified from the erythromycin-resistant isolate FR4991, confirming the presence of a G at position 2047 in the 3 copies of the 23S rRNA gene. *BbsI* did not cleave the DNA amplified from the erythromycin-sensitive isolates FR4929 and FR4930 indicating that they have no A2047G mutation in any of the 3 copies of the 23S rRNA gene.

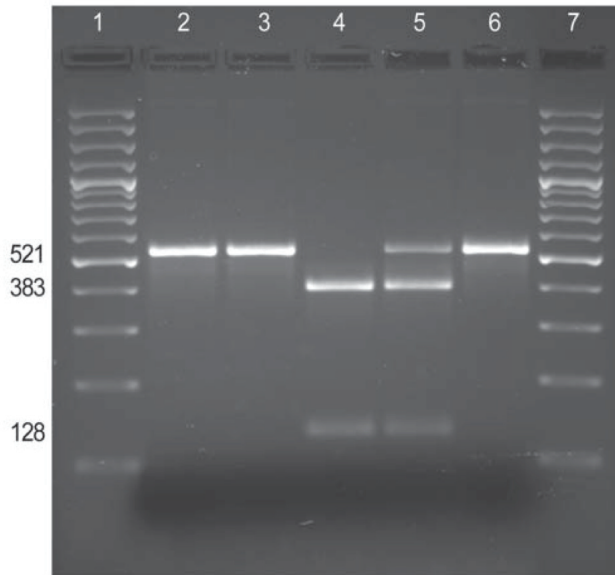


Figure. Screening for the A2047G mutation by PCR–restriction fragment length polymorphism analysis. The 521-bp fragment of the 23S rDNA gene amplified by PCR from the *Bordetella pertussis* clinical isolates (FR4229, FR4930, and FR4991) and controls (A228 and Tohama I) was digested with the endonuclease *BbsI*. Lanes 1 and 7, M, 100-bp ladder (SM0321; Fermentas, St. Leon-Rot, Germany); lane 2, *B. pertussis* FR4929; lane 3, *B. pertussis* FR4930; lane 4, *B. pertussis* FR4991; lane 5, control *B. pertussis* A228 (erythromycin resistant, heterozygous); lane 6, control *B. pertussis* Tohama (erythromycin susceptible).

Conclusions

The patient was brought for treatment with severe whooping cough which required ICU management and 2 courses of blood exchange. Nevertheless, *B. pertussis* resistance to macrolides is unlikely to be the cause of this severity because the infecting strain was found twice to be sensitive to all macrolides, and acquired resistance subsequently. However, despite appropriate treatments, we could not eradicate *B. pertussis*, and cultures were positive after 2 courses of macrolides and 1 course of cotrimoxazole given for an associated staphylococcal infection. Presumably, this prolonged carriage favored the acquisition of resistance.

This observation confirms the need for maintaining the ability to culture *B. pertussis* isolates to analyze the evolution of their characteristics as well as their antimicrobial drug resistance. Monitoring for macrolide resistance is thus essential when investigating individual treatment failures, in particular, in infants <6 months of age. The resistance mechanism we report is similar to that described for an isolate collected in the United States, but these findings do not rule out the potential for the emergence of alternative resistance mechanisms.

Acknowledgment

We thank Gary Sanden for the gift of the isolate A228.

This study was supported by the Institut Pasteur Fondation and the Institut de Veille Sanitaire.

Ms Guillot is assistant director of the French National Center of Reference of Whooping Cough and Other Bordetellosis and engineer in the Molecular Prevention and Therapy of Human Diseases Unit, Institut Pasteur, Paris. Her research interests focus on the molecular evolution of *Bordetella* in relation to clinical and public health problems, comparative genomic analysis, and development of tools to analyze gene expression.

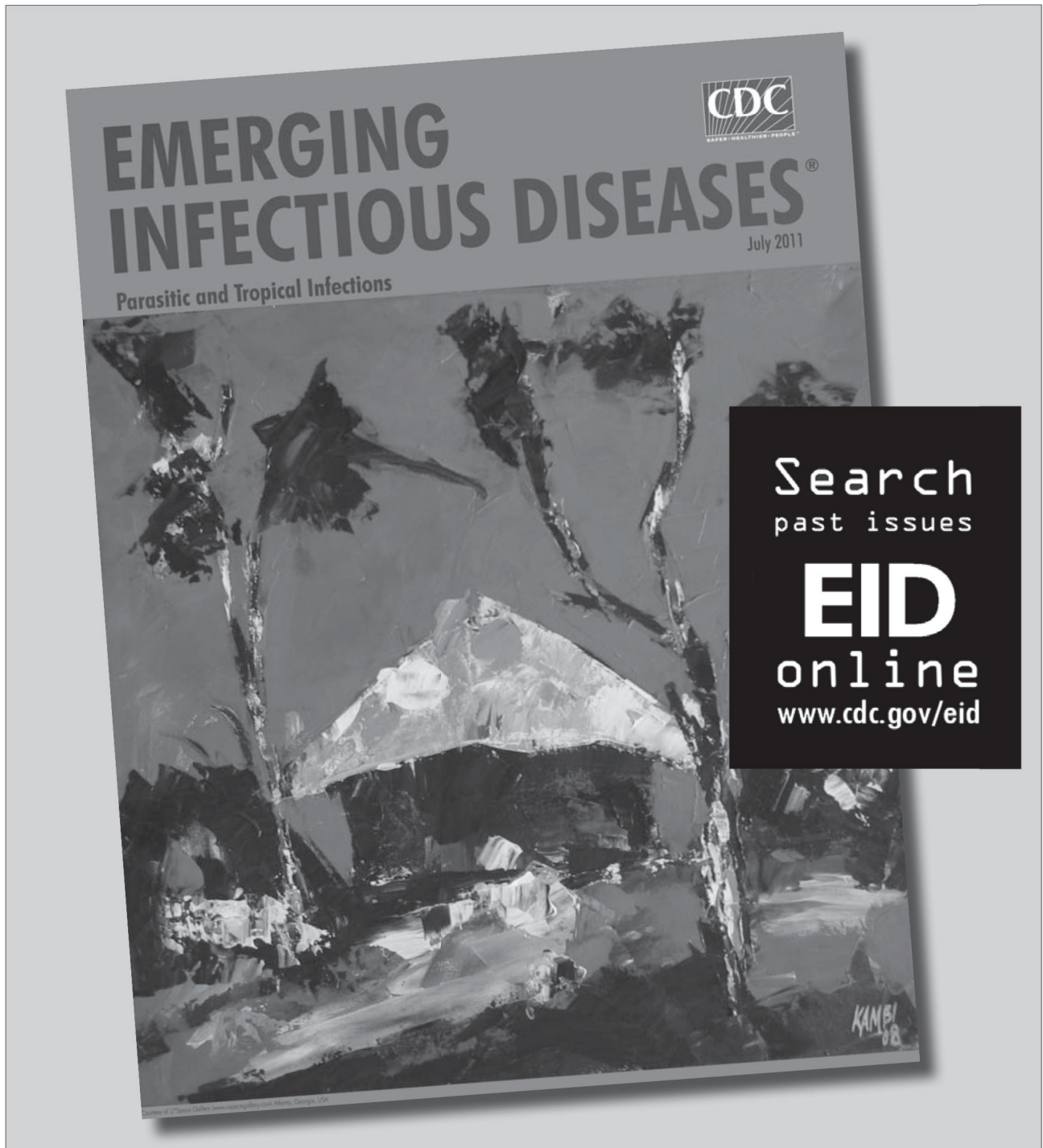
References

1. Haut Conseil de la Santé Publique. Commission spécialisée sécurité sanitaire, Comité technique des vaccinations. Rapport relatif à la conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de coqueluche. 5 Septembre 2008 [cited 2012 Apr 10]. http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20080905_coqueluche.pdf
2. Bartkus JM, Juni BA, Ehresmann K, Miller CA, Sanden GN, Cassidy PK, et al. Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1167–72. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.3.1167-1172.2003>
3. Yao SM, Liaw GJ, Chen YY, Yen MH, Chen YH, Mu JJ, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella pertussis* in Taiwan prompted by a case of pertussis in a paediatric patient. *J Med Microbiol.* 2008;57:1577–80. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002857-0>

DISPATCHES

4. Cassidy PK, Tobin-D'Angelo M, Watson JR, Wu KH, Park MM, Sanden GN. Co-infection with two different strains of *Bordetella pertussis* in an infant. *J Med Microbiol*. 2008;57:388–91. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47602-0>
5. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. *Vaccine*. 2009;27:6034–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.074>
6. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*. 2003;35:32–40. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1227>

Address for correspondence: Nicole Guiso, Institut Pasteur, Unité de Prévention et Thérapies Moléculaires des Maladies Humaines, CNRS-URA 3012, 25 rue du Dr Roux 75724 Paris, Cedex 15, France; email: nicole.guiso@pasteur.fr



BIBLIOGRAPHIE

1. Onody, C., P. Matsiota-Bernard, and C. Nauciel, *Lack of resistance to erythromycin, rifampicin and ciprofloxacin in 98 clinical isolates of Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother, 1997. **39**(6): p. 815-6.
2. Dowling, J.N., D.A. McDevitt, and A.W. Pasculle, *Isolation and preliminary characterization of erythromycin-resistant variants of Legionella micdadei and Legionella pneumophila*. Antimicrob Agents Chemother, 1985. **27**(2): p. 272-4.
3. Nielsen, K., J.M. Bangsberg, and 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): p. 43-8.
4. Nielsen, K., et al., *Sequencing of the rpoB gene in Legionella pneumophila and characterization of mutations associated with rifampin resistance in the Legionellaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(10): p. 2679-83.
5. Almahmoud, I., et al., *Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(2): p. 284-93.
6. Jarraud, S. and J. Freney, *Legionella*. Lavoisier ed, ed. E.T. DOC. 2012, Paris.
7. Brenner, D.J., A.G. Steigerwalt, and J.E. McDade, *Classification of the Legionnaires' disease bacterium: Legionella pneumophila, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova*. Ann Intern Med, 1979. **90**(4): p. 656-8.
8. Woese, C.R., *Bacterial evolution*. Microbiol Rev, 1987. **51**(2): p. 221-71.
9. Fry, N.K., et al., *The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae*. J Gen Microbiol, 1991. **137**(5): p. 1215-22.
10. Garrity, J.M., A. Brown, and R.M. Vickers, *Tatlockia and Fluoribacter: two new genera of organisms resembling Legionella pneumophila*. Int J Syst Bacteriol, 1980. **30**: p. 609-14.
11. Luck, P.C., et al., *Legionella dresdenensis sp. nov., isolated from river water*. Int J Syst Evol Microbiol, 2010. **60**(Pt 11): p. 2557-62.
12. Pearce, M.M., et al., *Legionella cardiaca sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart*. Int J Syst Evol Microbiol, 2012. **62**(Pt 12): p. 2946-54.
13. Campocasso, A., et al., *Legionella tunisiensis sp. nov. and Legionella massiliensis sp. nov., isolated from environmental water samples*. Int J Syst Evol Microbiol, 2012. **62**(Pt 12): p. 3003-6.
14. Yang, G., et al., *Legionella nagasakiensis sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia*. Int J Syst Evol Microbiol, 2012. **62**(Pt 2): p. 284-8.
15. Kuroki, H., et al., *Legionella impletisoli sp. nov. and Legionella yabuuchiae sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan*. Syst Appl Microbiol, 2007. **30**(4): p. 273-9.
16. Adeleke, A.A., et al., *Legionella drozanskii sp. nov., Legionella rowbothamii sp. nov. and Legionella fallonii sp. nov.: three unusual new Legionella species*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 3): p. 1151-60.
17. Hookey, J.V., et al., *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**: p. 526-531.
18. La Scola, B., et al., *Legionella drancourtii sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 3): p. 699-703.
19. Diederren, B.M., *Legionella spp. and Legionnaires' disease*. J Infect, 2008. **56**(1): p. 1-12.
20. Beaute, J., P. Zucs, and B. de Jong, *Legionnaires disease in Europe, 2009-2010*. Euro Surveill, 2013. **18**(10): p. 20417.
21. Kozak, N.A., C.E. Lucas, and J.M. Winchell, *Identification of Legionella in the environment*. Methods Mol Biol, 2013. **954**: p. 3-25.
22. Sakamoto, R., et al., *Legionella pneumophila in rainwater on roads*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(8): p. 1295-7.
23. Casati, S., et al., *Compost facilities as a reservoir of Legionella pneumophila and other Legionella species*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(7): p. 945-7.

24. Conza, L., S.C. Pagani, and V. Gaia, *Presence of Legionella and free-living Amoebae in composts and bioaerosols from composting facilities*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68244.
25. Lindsay, D.S., et al., *Legionella longbeachae serogroup 1 infections linked to potting compost*. J Med Microbiol, 2012. **61**(Pt 2): p. 218-22.
26. Whiley, H. and R. Bentham, *Legionella longbeachae and legionellosis*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(4): p. 579-83.
27. Katz, S.M. and J.M. Hammel, *The effect of drying, heat, and pH on the survival of Legionella pneumophila*. Ann Clin Lab Sci, 1987. **17**(3): p. 150-6.
28. Declerck, P., *Biofilms: the environmental playground of Legionella pneumophila*. Environ Microbiol, 2010. **12**(3): p. 557-66.
29. Declerck, P., et al., *Detection of Legionella spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments*. Water Res, 2007. **41**(14): p. 3159-67.
30. Ohno, A., et al., *Factors influencing survival of Legionella pneumophila serotype 1 in hot spring water and tap water*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(5): p. 2540-7.
31. Borella, P., et al., *Legionella infection risk from domestic hot water*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(3): p. 457-64.
32. Rowbotham, T.J., *Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae*. J Clin Pathol, 1980. **33**(12): p. 1179-83.
33. Greub, G. and D. Raoult, *Microorganisms resistant to free-living amoebae*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(2): p. 413-33.
34. Molmeret, M., et al., *Disruption of the phagosomal membrane and egress of Legionella pneumophila into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and Acanthamoeba polyphaga*. Infect Immun, 2004. **72**(7): p. 4040-51.
35. Segal, G. and H.A. Shuman, *Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within Acanthamoeba castellanii and human macrophages*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2117-24.
36. Bruggemann, H., et al., *Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of Legionella pneumophila*. Cell Microbiol, 2006. **8**(8): p. 1228-40.
37. Molmeret, M., et al., *Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(1): p. 20-8.
38. Corsaro, D., et al., *Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants*. Int J Hyg Environ Health, 2010. **213**(3): p. 158-66.
39. Loret, J.F. and G. Greub, *Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment*. Int J Hyg Environ Health, 2010. **213**(3): p. 167-75.
40. Fields, B.S., *The molecular ecology of Legionellae*. Trends Microbiol, 1996. **4**(7): p. 286-90.
41. Garcia, M.T., et al., *Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection*. Environ Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1267-77.
42. Steinert, M., et al., *Resuscitation of viable but nonculturable Legionella pneumophila Philadelphia JR32 by Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(5): p. 2047-53.
43. Hwang, M.G., H. Katayama, and S. Ohgaki, *Effect of intracellular resuscitation of Legionella pneumophila in Acanthamoeba polyphaga cells on the antimicrobial properties of silver and copper*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(23): p. 7434-9.
44. Garduno, R.A., et al., *Intracellular growth of Legionella pneumophila gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms*. Infect Immun, 2002. **70**(11): p. 6273-83.
45. Cirillo, J.D., S. Falkow, and L.S. Tompkins, *Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3254-61.
46. Brieland, J., et al., *Coinoculation with Hartmannella vermiformis enhances replicative Legionella pneumophila lung infection in a murine model of Legionnaires' disease*. Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2449-56.

47. Thomas, V., et al., *Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant*. Environ Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2728-45.
48. Berk, S.G., et al., *Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(23): p. 7440-4.
49. Taylor, M., K. Ross, and R. Bentham, *Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems*. Microb Ecol, 2009. **58**(3): p. 538-47.
50. Thomas, V., et al., *Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(4): p. 2428-38.
51. Dey, R., et al., *Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium Legionella pneumophila*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **290**(1): p. 10-7.
52. Fields, B.S., et al., *Virulence of a Legionella anisa strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models*. Infect Immun, 1990. **58**(9): p. 3139-42.
53. Neumeister, B., et al., *Multiplication of different Legionella species in Mono Mac 6 cells and in Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(4): p. 1219-24.
54. Buse, H.Y. and N.J. Ashbolt, *Differential growth of Legionella pneumophila strains within a range of amoebae at various temperatures associated with in-premise plumbing*. Lett Appl Microbiol, 2011. **53**(2): p. 217-24.
55. Cassier, P., et al., *Hospital washbasin water: risk of Legionella-contaminated aerosol inhalation*. J Hosp Infect, 2013.
56. Yiallourous, P.K., et al., *First outbreak of nosocomial Legionella infection in term neonates caused by a cold mist ultrasonic humidifier*. Clin Infect Dis, 2013. **57**(1): p. 48-56.
57. Bonilla Escobar, B.A., J.C. Montero Rubio, and G. Martinez Juarez, *Pneumonia from Legionella pneumophila associated with the use of a home humidifier in an immunocompetent girl*. Med Clin (Barc), 2013.
58. Campese, C., et al., *Cluster of Legionnaires' disease associated with a public whirlpool spa, France, April-May 2010*. Euro Surveill, 2010. **15**(26).
59. Euser, S.M., M. Pelgrim, and J.W. den Boer, *Legionnaires' disease and Pontiac fever after using a private outdoor whirlpool spa*. Scand J Infect Dis, 2010. **42**(11-12): p. 910-6.
60. Garcia-Vidal, C., et al., *Rainfall is a risk factor for sporadic cases of Legionella pneumophila pneumonia*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61036.
61. Fisman, D.N., et al., *It's not the heat, it's the humidity: wet weather increases legionellosis risk in the greater Philadelphia metropolitan area*. J Infect Dis, 2005. **192**(12): p. 2066-73.
62. Shiota, R., et al., *Legionella pneumophila serogroup 3 isolated from a patient of pneumonia developed after drowning in bathtub of a hot spring spa*. Kansenshogaku Zasshi, 1995. **69**(12): p. 1356-64.
63. Tokuda, H., et al., *A case of fatal pneumonia caused by Legionella pneumophila serogroup 6 developed after drowning in a public bath*. Kansenshogaku Zasshi, 1997. **71**(2): p. 169-74.
64. Nozue, T., et al., *Legionella pneumonia associated with adult respiratory distress syndrome caused by Legionella pneumophila serogroup 3*. Intern Med, 2005. **44**(1): p. 73-8.
65. Cirillo, S.L., J. Lum, and J.D. Cirillo, *Identification of novel loci involved in entry by Legionella pneumophila*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 6): p. 1345-59.
66. Horwitz, M.A., *Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil*. Cell, 1984. **36**(1): p. 27-33.
67. Meresse, S., et al., *Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(7): p. E183-8.

68. Gao, L.Y., O.S. Harb, and Y. Abu Kwaik, *Utilization of similar mechanisms by Legionella pneumophila to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa*. Infect Immun, 1997. **65**(11): p. 4738-46.
69. Vogel, J.P. and R.R. Isberg, *Cell biology of Legionella pneumophila*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(1): p. 30-4.
70. Amer, A.O., B.G. Byrne, and M.S. Swanson, *Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes*. Autophagy, 2005. **1**(1): p. 53-8.
71. Byrne, B. and M.S. Swanson, *Expression of Legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions*. Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3029-34.
72. Roig, J. and J. Rello, *Legionnaires' disease: a rational approach to therapy*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(5): p. 1119-29.
73. Woodhead, M., *Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns*. Eur Respir J Suppl, 2002. **36**: p. 20s-27s.
74. Campese, C., et al., *Progress in the surveillance and control of Legionella infection in France, 1998-2008*. Int J Infect Dis, 2011. **15**(1): p. e30-7.
75. Wewalka, G., et al., *Dual infections with different Legionella strains*. Clin Microbiol Infect, 2013.
76. McNally, C., et al., *Potential importance of Legionella species as etiologies in community acquired pneumonia (CAP)*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2000. **38**(2): p. 79-82.
77. Sopena, N., et al., *Comparative study of community-acquired pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae, Legionella pneumophila or Chlamydia pneumoniae*. Scand J Infect Dis, 2004. **36**(5): p. 330-4.
78. 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): p. 483-9.
79. Viasus, D., et al., *Community-acquired Legionella pneumophila pneumonia: a single-center experience with 214 hospitalized sporadic cases over 15 years*. Medicine (Baltimore), 2013. **92**(1): p. 51-60.
80. Sopena, N., et al., *Comparative study of the clinical presentation of Legionella pneumonia and other community-acquired pneumonias*. Chest, 1998. **113**(5): p. 1195-200.
81. Hung, Y.P., et al., *Comparisons of clinical characters in patients with pneumococcal and Legionella pneumonia*. J Microbiol Immunol Infect, 2010. **43**(3): p. 215-21.
82. Cunha, B.A., *Hypophosphatemia: diagnostic significance in Legionnaires' disease*. Am J Med, 2006. **119**(7): p. e5-6.
83. Fiumefreddo, R., et al., *Clinical predictors for Legionella in patients presenting with community-acquired pneumonia to the emergency department*. BMC Pulm Med, 2009. **9**: p. 4.
84. Prat, C., et al., *Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia*. J Infect, 2006. **52**(3): p. 169-77.
85. Yu, V.L., et al., *Legionnaires' disease: new clinical perspective from a prospective pneumonia study*. Am J Med, 1982. **73**(3): p. 357-61.
86. Mulazimoglu, L. and V.L. Yu, *Can Legionnaires disease be diagnosed by clinical criteria? A critical review*. Chest, 2001. **120**(4): p. 1049-53.
87. Cunha, B.A., *Clinical features of legionnaires' disease*. Semin Respir Infect, 1998. **13**(2): p. 116-27.
88. Gupta, S.K., T.F. Imperiale, and G.A. Sarosi, *Evaluation of the Winthrop-University Hospital criteria to identify Legionella pneumonia*. Chest, 2001. **120**(4): p. 1064-71.
89. Bellmann-Weiler, R., et al., *Clinical potential of C-reactive protein and procalcitonin serum concentrations to guide differential diagnosis and clinical management of pneumococcal and Legionella pneumonia*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(5): p. 1915-7.
90. Yu, H., et al., *Lung abscess caused by Legionella species: implication of the immune status of hosts*. Intern Med, 2009. **48**(23): p. 1997-2002.
91. O'Reilly, K.M., et al., *Persistent culture-positive Legionella infection in an immunocompromised host*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(10): p. e87-9.

92. Girard, L.P. and D.B. Gregson, *Community-acquired lung abscess caused by Legionella micdadei in a myeloma patient receiving thalidomide treatment*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 3135-7.
93. Lettinga, K.D., et al., *Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder among survivors of an outbreak of Legionnaires disease*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(1): p. 11-7.
94. Mykietiuk, A., et al., *Clinical outcomes for hospitalized patients with Legionella pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(6): p. 794-9.
95. Gacouin, A., et al., *Severe pneumonia due to Legionella pneumophila: prognostic factors, impact of delayed appropriate antimicrobial therapy*. Intensive Care Med, 2002. **28**(6): p. 686-91.
96. Jacobson, K.L., et al., *Legionella pneumonia in cancer patients*. Medicine (Baltimore), 2008. **87**(3): p. 152-9.
97. Gudiol, C., et al., *Clinical features and outcomes of Legionnaires' disease in solid organ transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2009. **11**(1): p. 78-82.
98. Heath, C.H., D.I. Grove, and D.F. Looke, *Delay in appropriate therapy of Legionella pneumonia associated with increased mortality*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996. **15**(4): p. 286-90.
99. Chidiac, C., et al., *Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France*. Eur Respir J, 2012. **39**(4): p. 963-70.
100. Sopena, N., et al., *Community-acquired legionella pneumonia in elderly patients: characteristics and outcome*. J Am Geriatr Soc, 2007. **55**(1): p. 114-9.
101. Greenberg, D., et al., *Problem pathogens: paediatric legionellosis--implications for improved diagnosis*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(8): p. 529-35.
102. Lanternier, F., et al., *Incidence and Risk Factors of Legionella pneumophila Pneumonia During Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy: A Prospective French Study*. Chest, 2013. **144**(3): p. 990-8.
103. Hawn, T.R., et al., *Myeloid differentiation primary response gene (88)- and toll-like receptor 2-deficient mice are susceptible to infection with aerosolized Legionella pneumophila*. J Infect Dis, 2006. **193**(12): p. 1693-702.
104. Hawn, T.R., et al., *A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to Legionnaires' disease*. J Exp Med, 2003. **198**(10): p. 1563-72.
105. Merx, S., et al., *Characterization and functional investigation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TLR5 gene*. Hum Mutat, 2006. **27**(3): p. 293.
106. Zhang, F., et al., *Polymorphisms in toll-like receptors 2, 4 and 5 are associated with Legionella pneumophila infection*. Infection, 2013. **41**(5): p. 941-8.
107. Perpoint, T., et al., *PCR-confirmed Legionella non-pneumophila meningoencephalitis*. Med Mal Infect, 2013. **43**(1): p. 32-4.
108. Charles, M., et al., *Legionella micdadei brain abscess*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(2): p. 701-4.
109. Fukuta, Y., et al., *Legionella micdadei prosthetic valve endocarditis complicated by brain abscess: case report and review of the literature*. Scand J Infect Dis, 2012. **44**(6): p. 414-8.
110. Leggieri, N., et al., *Legionella longbeachae and endocarditis*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(1): p. 95-7.
111. Samuel, V., A.A. Bajwa, and J.D. Cury, *First case of Legionella pneumophila native valve endocarditis*. Int J Infect Dis, 2011. **15**(8): p. e576-7.
112. Svirni, S., et al., *Legionella feeleeii pneumonia and pericarditis*. J Infect, 1997. **34**(3): p. 277-9.
113. Loidant, S., J.C. Lagier, and B. La Scola, *Identification of Legionella feeleeii cellulitis*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(1): p. 145-6.
114. Kilborn, J.A., et al., *Necrotizing cellulitis caused by Legionella micdadei*. Am J Med, 1992. **92**(1): p. 104-6.

115. Waldor, M.K., B. Wilson, and M. Swartz, *Cellulitis caused by Legionella pneumophila*. Clin Infect Dis, 1993. **16**(1): p. 51-3.
116. Gubler, J.G., et al., *Recurrent soft tissue abscesses caused by Legionella cincinnatiensis*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(12): p. 4568-70.
117. Just, S.A., et al., *Detection of Legionella bozemanæ, a new cause of septic arthritis, by PCR followed by specific culture*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(12): p. 4180-2.
118. Flendrie, M., et al., *Septic arthritis caused by Legionella dumoffii in a patient with systemic lupus erythematosus-like disease*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(2): p. 746-9.
119. Fernandez-Cruz, A., et al., *Legionella micdadei, a new cause of prosthetic joint infection*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(9): p. 3409-10.
120. Warner, C.L., P.B. Fayad, and R.R. Heffner, Jr., *Legionella myositis*. Neurology, 1991. **41**(5): p. 750-2.
121. Arnow, P.M., E.J. Boyko, and E.L. Friedman, *Perirectal abscess caused by Legionella pneumophila and mixed anaerobic bacteria*. Ann Intern Med, 1983. **98**(2): p. 184-5.
122. Arnouts, P.J., et al., *Legionella pneumophila peritonitis in a kidney transplant patient*. Scand J Infect Dis, 1991. **23**(1): p. 119-22.
123. Schmidt, T., et al., *Legionella infection of the colon presenting as acute attack of ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1989. **97**(3): p. 751-5.
124. Megarbane, B., et al., *Acute pancreatitis caused by severe Legionella pneumophila infection*. Infection, 2000. **28**(5): p. 329-31.
125. Ziemer, M., et al., *Exanthema in Legionnaires' disease mimicking a severe cutaneous drug reaction*. Clin Exp Dermatol, 2009. **34**(5): p. e72-4.
126. Calza, L., et al., *Legionnaires' disease associated with macular rash: two cases*. Acta Derm Venereol, 2005. **85**(4): p. 342-4.
127. Tossa, P., et al., *Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies*. BMC Public Health, 2006. **6**: p. 112.
128. Kohler, R.B., W.C. Winn, Jr., and L.J. Wheat, *Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease*. J Clin Microbiol, 1984. **20**(4): p. 605-7.
129. 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): p. 845-8.
130. Berdal, B.P., C.E. Farshy, and J.C. Feeley, *Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay*. J Clin Microbiol, 1979. **9**(5): p. 575-8.
131. Dominguez, J., et al., *Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of Legionella antigen in urine samples*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999. **18**(12): p. 896-8.
132. Guerrero, C., et al., *Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(1): p. 467-8.
133. Arakaki, N., et al., *Evaluation of urinary antigen detection methods for rapid diagnosis of Legionella pneumonia*. Kansenshogaku Zasshi, 1999. **73**(5): p. 421-8.
134. Dominguez, J.A., 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): p. 2718-22.
135. Bruin, J.P., et al., *Evaluation of Legionella V-TesT for the detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(7): p. 899-900.
136. Bruin, J.P. and B.M. Diederer, *Evaluation of Meridian TRU Legionella(R), a new rapid test for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine samples*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013. **32**(3): p. 333-4.

137. Diederer, B.M. and M.F. Peeters, *Evaluation of the SAS Legionella Test, a new immunochromatographic assay for the detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(1): p. 86-8.
138. Diederer, B.M. and M.F. Peeters, *Evaluation of two new immunochromatographic assays (Rapid U Legionella antigen test and SD Biotest Legionella antigen test) for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(8): p. 2991-3.
139. Helbig, J.H., 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): p. 509-16.
140. Olsen, C.W., et al., *Comparison of the sensitivity of the Legionella urinary antigen EIA kits from Binax and Biotest with urine from patients with infections caused by less common serogroups and subgroups of Legionella*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009. **28**(7): p. 817-20.
141. Benson, R.F., P.W. Tang, and B.S. 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): p. 2763-5.
142. Helbig, J.H., et al., *Antigenic lipopolysaccharide components of Legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(11): p. 2841-5.
143. Helbig, J.H., 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): p. 838-40.
144. Deforges, L., et al., *Case of false-positive results of the urinary antigen test for Legionella pneumophila*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(4): p. 953-4.
145. Murdoch, D.R., *Diagnosis of Legionella infection*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(1): p. 64-9.
146. Ingram, J.G. and J.F. Plouffe, *Danger of sputum purulence screens in culture of Legionella species*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(1): p. 209-10.
147. Buesching, W.J., R.A. Brust, and L.W. Ayers, *Enhanced primary isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens by low-pH treatment*. J Clin Microbiol, 1983. **17**(6): p. 1153-5.
148. Dennis, P.J., D. Green, and B.P. Jones, *A note on the temperature tolerance of Legionella*. J Appl Bacteriol, 1984. **56**(2): p. 349-50.
149. Edelstein, P.H., J.B. Snitzer, and J.A. Bridge, *Enhancement of recovery of Legionella pneumophila from contaminated respiratory tract specimens by heat*. J Clin Microbiol, 1982. **16**(6): p. 1061-5.
150. Feeley, J.C., et al., *Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol, 1979. **10**(4): p. 437-41.
151. Hoffman, P.S., L. Pine, and S. Bell, *Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture Legionella pneumophila: catalytic decomposition by charcoal*. Appl Environ Microbiol, 1983. **45**(3): p. 784-91.
152. Edelstein, P.H., *Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens*. J Clin Microbiol, 1981. **14**(3): p. 298-303.
153. Wadowsky, R.M. and R.B. Yee, *Glycine-containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens*. Appl Environ Microbiol, 1981. **42**(5): p. 768-72.
154. Lee, T.C., et al., *Growth of 28 Legionella species on selective culture media: a comparative study*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(10): p. 2764-8.
155. Helbig, J.H., et al., *Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002. **21**(10): p. 710-6.
156. Fry, N.K., et al., *Identification of Legionella spp. by 19 European reference laboratories: results of the European Working Group for Legionella Infections External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity*

- potentiator gene and dedicated online tools. Clin Microbiol Infect, 2007. 13(11): p. 1119-24.*
157. Grattard, F., et al., *Analysis of the genetic diversity of Legionella by sequencing the 23S-5S ribosomal intergenic spacer region: from phylogeny to direct identification of isolates at the species level from clinical specimens. Microbes Infect, 2006. 8(1): p. 73-83.*
 158. Muder, R.R. and V.L. Yu, *Infection due to Legionella species other than L. pneumophila. Clin Infect Dis, 2002. 35(8): p. 990-8.*
 159. Chester, B., et al., *Isolation of Legionella pneumophila serogroup 1 from blood with nonsupplemented blood culture bottles. J Clin Microbiol, 1983. 17(2): p. 195-7.*
 160. Edelstein, P.H., R.D. Meyer, and S.M. Finegold, *Isolation of Legionella pneumophila from blood. Lancet, 1979. 1(8119): p. 750-1.*
 161. Macrae, A.D., P.W. Greaves, and P. Platts, *Isolation of Legionella pneumophila from blood culture. Br Med J, 1979. 2(6199): p. 1189-90.*
 162. Farrington, M. and G.L. French, *Legionella pneumophila seen in Gram stains of respiratory secretions and recovered from conventional blood cultures. J Infect, 1983. 6(2): p. 123-7.*
 163. Rihs, J.D., et al., *Isolation of Legionella pneumophila from blood with the BACTEC system: a prospective study yielding positive results. J Clin Microbiol, 1985. 22(3): p. 422-4.*
 164. Reinhardt, J.F., C. Nakahama, and P.H. Edelstein, *Comparison of blood culture methods for recovery of Legionella pneumophila from the blood of guinea pigs with experimental infection. J Clin Microbiol, 1987. 25(4): p. 719-21.*
 165. Rowbotham, T.J., *Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. J Clin Pathol, 1983. 36(9): p. 978-86.*
 166. Rowbotham, T.J., *Isolation of Legionella pneumophila serogroup 1 from human feces with use of amebic cocultures. Clin Infect Dis, 1998. 26(2): p. 502-3.*
 167. McWhinney, P.H., P.L. Rangunathan, and T.J. Rowbotham, *Failure to produce detectable antibodies to Legionella pneumophila by an immunocompetent adult. J Infect, 2000. 41(1): p. 91-2.*
 168. La Scola, B., et al., *Isolation of Legionella anisa using an amoebic coculture procedure. J Clin Microbiol, 2001. 39(1): p. 365-6.*
 169. Marrie, T.J., et al., *Legionella-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. Emerg Infect Dis, 2001. 7(6): p. 1026-9.*
 170. Descours, G., et al., *Contribution of amoebic coculture to recovery of Legionella isolates from respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months. J Clin Microbiol, 2012. 50(5): p. 1725-6.*
 171. Jaulhac, B., et al., *Detection of Legionella spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. J Clin Microbiol, 1992. 30(4): p. 920-4.*
 172. Matsiota-Bernard, P., et al., *Evaluation of commercial amplification kit for detection of Legionella pneumophila in clinical specimens. J Clin Microbiol, 1994. 32(6): p. 1503-5.*
 173. Maiwald, M., et al., *Detection of Legionella DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1995. 14(1): p. 25-33.*
 174. Helbig, J.H., et al., *Diagnostic relevance of the detection of Legionella DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999. 18(10): p. 716-22.*
 175. Murdoch, D.R., et al., *Use of the polymerase chain reaction to detect Legionella DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. Clin Infect Dis, 1996. 23(3): p. 475-80.*
 176. Wilson, D., et al., *Comparison of five methods for extraction of Legionella pneumophila from respiratory specimens. J Clin Microbiol, 2004. 42(12): p. 5913-6.*
 177. Cloud, J.L., et al., *Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Microbiol, 2000. 38(5): p. 1709-12.*

178. Hayden, R.T., et al., *Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(7): p. 2618-26.
179. Koide, M., et al., *Detection of legionella species in clinical samples: Comparison of polymerase chain reaction and urinary antigen detection kits*. Infection, 2006. **34**(5): p. 264-8.
180. Lindsay, D.S., et al., *Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 3): p. 183-7.
181. Maurin, M., et al., *Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(4): p. 379-84.
182. Korosec, P., et al., *The influence of antimicrobial therapy on the sensitivity of Legionella PCR*. Scand J Infect Dis, 2006. **38**(10): p. 925-8.
183. Lindsay, D.S., W.H. Abraham, and R.J. Fallon, *Detection of mip gene by PCR for diagnosis of Legionnaires' disease*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(12): p. 3068-9.
184. Matsiota-Bernard, P., S. Waser, and G. Vroni, *Detection of Legionella pneumophila DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia*. Clin Microbiol Infect, 2000. **6**(4): p. 223-5.
185. Murdoch, D.R. and S.T. 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): p. 382-3.
186. Diederer, B.M., et al., *Detection and quantification of Legionella pneumophila DNA in serum: case reports and review of the literature*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 5): p. 639-42.
187. Murdoch, D.R., et al., *Detection of Legionella DNA in guinea pig peripheral leukocytes, urine and plasma by the polymerase chain reaction*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999. **18**(6): p. 445-7.
188. Socan, M., D. Kese, and N. Marinic-Fiser, *Polymerase chain reaction for detection of Legionellae DNA in urine samples from patients with community-acquired pneumonia*. Folia Microbiol (Praha), 2000. **45**(5): p. 469-72.
189. Wilkinson, H.W., et al., *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): p. 685-9.
190. Taylor, A.G. and T.G. Harrison, *Formalised yolk sac antigen in early diagnosis of Legionnaires' disease caused by Legionella pneumophila serogroup 1*. Lancet, 1981. **2**(8246): p. 591-2.
191. Nguyen, T., P. Matsiota-Bernard, and C. Nauciel, *Evaluation of an ELISA technique for the serodiagnosis of legionnaires' disease*. Pathol Biol (Paris), 1995. **43**(5): p. 407-10.
192. Bangsberg, J.M., et al., *Performance of four different indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to detect specific IgG, IgA, and IgM in Legionnaires' disease*. APMIS, 1994. **102**(7): p. 501-8.
193. Collins, M.T., et al., *Agglutinating antibody titers to members of the family Legionellaceae in cystic fibrosis patients as a result of cross-reacting antibodies to Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol, 1984. **19**(6): p. 757-62.
194. Bornstein, N., et al., *Evaluation of the incidence of serological cross reactions between Legionella and Mycoplasma or Chlamydia*. Pathol Biol (Paris), 1984. **32**(3): p. 165-8.
195. Boswell, T.C., L.E. Marshall, and G. Kudesia, *False-positive Legionella titres in routine clinical serology testing detected by absorption with Campylobacter: implications for the serological diagnosis of legionnaires' disease*. J Infect, 1996. **32**(1): p. 23-6.

196. Gray, J.J., et al., *Serological cross-reaction between Legionella pneumophila and Citrobacter freundii in indirect immunofluorescence and rapid microagglutination tests*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(1): p. 200-1.
197. Benhamou, D., et al., *Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment*. Med Mal Infect, 2005. **35**(1): p. 1-5.
198. Dumarcet, N., *Updates for the antibiotic treatment of legionellosis in adults*. Agence francaise de securite sanitaire des produits de sante. Med Mal Infect, 2012. **42**(9): p. 393-403, 403-13.
199. Lim, W.S., et al., *BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009*. Thorax, 2009. **64 Suppl 3**: p. iii1-55.
200. Plouffe, J.F., et al., *Azithromycin in the treatment of Legionella pneumonia requiring hospitalization*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(11): p. 1475-80.
201. Haranaga, S., et al., *Intravenous ciprofloxacin versus erythromycin in the treatment of Legionella pneumonia*. Intern Med, 2007. **46**(7): p. 353-7.
202. Woodhead, M., et al., *Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17 Suppl 6**: p. E1-59.
203. Mandell, L.A., et al., *Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults*. Clin Infect Dis, 2007. **44 Suppl 2**: p. S27-72.
204. Edelstein, P.H. and M.A. Edelstein, *In vitro activity of azithromycin against clinical isolates of Legionella species*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(1): p. 180-1.
205. Edelstein, P.H., *Rifampin resistance of Legionella pneumophila is not increased during therapy for experimental Legionnaires disease: study of rifampin resistance using a guinea pig model of Legionnaires disease*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(1): p. 5-9.
206. Tan, J.S., et al., *Persistently positive culture results in a patient with community-acquired pneumonia due to Legionella pneumophila*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(11): p. 1562-6.
207. Glaser, S., et al., *Persistent culture-positive Legionella infection in an immunocompetent adult*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(5): p. 765-6.
208. Tattevin, P., et al., *Legionella pneumophila: persistent positive sputum culture in an HIV-infected patient*. Clin Microbiol Infect, 1998. **4**(11): p. 665-667.
209. Jonas, D., et al., *Development and mechanism of fluoroquinolone resistance in Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(2): p. 275-80.
210. Poliwoda, A., M. Krzyzak, and P.P. Wiczorek, *Supported liquid membrane extraction with single hollow fiber for the analysis of fluoroquinolones from environmental surface water samples*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(22): p. 3590-7.
211. Bruin, J.P., et al., *Correlation of MIC value and disk inhibition zone diameters in clinical Legionella pneumophila serogroup 1 isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013. **76**(3): p. 339-42.
212. Dowling, J.N., D.A. McDevitt, and A.W. Pasculle, *Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of members of the family Legionellaceae including erythromycin-resistant variants of Legionella micdadei*. J Clin Microbiol, 1984. **19**(6): p. 723-9.
213. Feeley, J.C., et al., *Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium*. J Clin Microbiol, 1978. **8**(3): p. 320-5.
214. Barker, J. and I.D. Farrell, *The effect of charcoal on MICs for Legionella*. J Antimicrob Chemother, 1986. **17**(1): p. 127.
215. Ristroph, J.D., K.W. Hedlund, and R.G. Allen, *Liquid medium for growth of Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol, 1980. **11**(1): p. 19-21.
216. Ruckdeschel, G. and 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**: p. 25-9.
217. Pendland, S.L., et al., *Comparison of charcoal- and starch-based media for testing susceptibilities of Legionella species to macrolides, azalides, and fluoroquinolones*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(11): p. 3004-6.

218. Schulin, T., et al., *Susceptibilities of Legionella spp. to newer antimicrobials in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(6): p. 1520-3.
219. Rhomberg, P.R., M.J. Bale, and R.N. Jones, *Application of the Etest to antimicrobial susceptibility testing of Legionella spp.* Diagn Microbiol Infect Dis, 1994. **19**(3): p. 175-8.
220. Pohlod, D.J., et al., *The effect of inoculum, culture medium and antimicrobial combinations on the in-vitro susceptibilities of Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother, 1981. **7**(4): p. 335-41.
221. Bruin, J.P., et al., *Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical Legionella pneumophila serogroup 1 isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **72**(1): p. 103-8.
222. 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): p. 2176-8.
223. Liebers, D.M., et al., *Susceptibility of Legionella pneumophila to eight antimicrobial agents including four macrolides under different assay conditions*. J Antimicrob Chemother, 1989. **23**(1): p. 37-41.
224. Jonas, D., et al., *Efficacy of moxifloxacin, trovafloxacin, clinafloxacin and levofloxacin against intracellular Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(2): p. 147-52.
225. Baltch, A.L., et al., *Antibacterial activities of gemifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and erythromycin against intracellular Legionella pneumophila and Legionella micdadei in human monocytes*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(1): p. 104-9.
226. Barker, J.E. and I.D. Farrell, *The effects of single and combined antibiotics on the growth of Legionella pneumophila using time-kill studies*. J Antimicrob Chemother, 1990. **26**(1): p. 45-53.
227. Baltch, A.L., R.P. Smith, and W. Ritz, *Inhibitory and bactericidal activities of levofloxacin, ofloxacin, erythromycin, and rifampin used singly and in combination against Legionella pneumophila*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(8): p. 1661-6.
228. Gomez-Lus, R., 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. **18**(1): p. 49-54.
229. Roch, N. and 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): p. 866-71.
230. Smith, R.P., et al., *Use of the microbial growth curve in postantibiotic effect studies of Legionella pneumophila*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(3): p. 1081-7.
231. Martin, S.J., et al., *In vitro activity of clarithromycin alone and in combination with ciprofloxacin or levofloxacin against Legionella spp.: enhanced effect by the addition of the metabolite 14-hydroxy clarithromycin*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1997. **29**(3): p. 167-71.
232. 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): p. 589-94.
233. 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): p. 206-10.
234. Higa, F., et al., *Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(5): p. 1392-8.
235. Stout, J.E., B. Arnold, and V.L. 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): p. 37-43.

236. Stout, J.E., B. Arnold, and V.L. Yu, *Activity of azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, dirithromycin, quinupristin/dalfopristin and erythromycin against Legionella species by intracellular susceptibility testing in HL-60 cells.* J Antimicrob Chemother, 1998. **41**(2): p. 289-91.
237. Schrock, J., B.A. Hackman, and J.F. Plouffe, *Susceptibility of ninety-eight clinical isolates of Legionella to macrolides and quinolones using the Etest.* Diagn Microbiol Infect Dis, 1997. **28**(4): p. 221-3.
238. Segreti, J., P. Meyer, and K. Kapell, *In vitro activity of macrolides against intracellular Legionella pneumophila.* Diagn Microbiol Infect Dis, 1996. **25**(3): p. 123-6.
239. Martin, S.J., et al., *In vitro synergy testing of macrolide-quinolone combinations against 41 clinical isolates of Legionella.* Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(6): p. 1419-21.
240. Collins, L.A., et al., *Comparative activities of piperacillin and tazobactam against clinical isolates of Legionella spp.* Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(1): p. 144-6.
241. Johnson, D.M., et al., *Antimicrobial activity of ten macrolide, lincosamine and streptogramin drugs tested against Legionella species.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992. **11**(8): p. 751-5.
242. Jones, R.N., M.E. Erwin, and M.S. Barrett, *In vitro activity of clarithromycin (TE-031, A-67268) and 14OH-clarithromycin alone and in combination against Legionella species.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1990. **9**(11): p. 846-8.
243. Hardy, D.J., et al., *Comparative in vitro activities of new 14-, 15-, and 16-membered macrolides.* Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(11): p. 1710-9.
244. Moffie, B.G. and R.P. Mouton, *Sensitivity and resistance of Legionella pneumophila to some antibiotics and combinations of antibiotics.* J Antimicrob Chemother, 1988. **22**(4): p. 457-62.
245. Edelstein, P.H. and R.D. Meyer, *Susceptibility of Legionella pneumophila to twenty antimicrobial agents.* Antimicrob Agents Chemother, 1980. **18**(3): p. 403-8.
246. Fu, K.P. and H.C. Neu, *Inactivation of beta-lactam antibiotics by Legionella pneumophila.* Antimicrob Agents Chemother, 1979. **16**(5): p. 561-4.
247. Stokes, D.H., B. Slocombe, and R. Sutherland, *Bactericidal effects of amoxicillin/clavulanic acid against Legionella pneumophila.* J Antimicrob Chemother, 1989. **23**(1): p. 43-51.
248. Edelstein, P.H. and M.A. Edelstein, *In vitro extracellular and intracellular activities of clavulanic acid and those of piperacillin and ceftriaxone alone and in combination with tazobactam against clinical isolates of Legionella species.* Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(2): p. 200-4.
249. Vildé, J.L., E. Dournon, and P. Rajagopalan, *Inhibition of Legionella pneumophila multiplication within human macrophages by antimicrobial agents.* Antimicrob Agents Chemother, 1986. **30**(5): p. 743-8.
250. Fitzgeorge, R.B., A.S. Featherstone, and 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**: p. 53-7.
251. Ramirez, J.A., et al., *Comparative study of the bactericidal activity of ampicillin/sulbactam and erythromycin against intracellular Legionella pneumophila.* J Antimicrob Chemother, 1993. **32**(1): p. 93-9.
252. Baltch, A.L., et al., *Antibacterial effects of levofloxacin, erythromycin, and rifampin in a human monocyte system against Legionella pneumophila.* Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(12): p. 3153-6.
253. Stout, J.E., et al., *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): p. 302-7.
254. Tano, E., O. Cars, and E. Lowdin, *Pharmacodynamic studies of moxifloxacin and erythromycin against intracellular Legionella pneumophila in an in vitro kinetic model.* J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(1): p. 240-2.

255. Horwitz, M.A. and S.C. Silverstein, *Intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria (Legionella pneumophila) in human monocytes is reversibly inhibited by erythromycin and rifampin*. J Clin Invest, 1983. **71**(1): p. 15-26.
256. Jonas, D., et al., *The effect of azithromycin on intracellular Legionella pneumophila in the Mono Mac 6 cell line at serum concentrations attainable in vivo*. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(3): p. 385-90.
257. Kashimoto, Y., et al., *Therapeutic efficacy of levofloxacin against a model of replicable Legionella pneumophila lung infection in DBA/2 mice*. Jpn J Antibiot, 2009. **62**(5): p. 452-9.
258. Edelstein, P.H., K. Calarco, and V.K. Yasui, *Antimicrobial therapy of experimentally induced Legionnaires' disease in guinea pigs*. Am Rev Respir Dis, 1984. **130**(5): p. 849-56.
259. Havlichek, D., D. Pohlod, and L. Saravolatz, *Comparison of ciprofloxacin and rifampicin in experimental Legionella pneumophila pneumonia*. J Antimicrob Chemother, 1987. **20**(6): p. 875-81.
260. Fitzgeorge, R.B., A.S. Featherstone, and A. Baskerville, *Efficacy of azithromycin in the treatment of guinea pigs infected with Legionella pneumophila by aerosol*. J Antimicrob Chemother, 1990. **25 Suppl A**: p. 101-8.
261. Nowicki, M., et al., *Comparative efficacy of five antibiotics on experimental airborne legionellosis in guinea-pigs*. J Antimicrob Chemother, 1988. **22**(4): p. 513-9.
262. Kitsukawa, K., J. Hara, and A. Saito, *Inhibition of Legionella pneumophila in guinea pig peritoneal macrophages by new quinolone, macrolide and other antimicrobial agents*. J Antimicrob Chemother, 1991. **27**(3): p. 343-53.
263. Saito, A., et al., *Susceptibility of Legionella pneumophila to ofloxacin in vitro and in experimental Legionella pneumonia in guinea pigs*. Antimicrob Agents Chemother, 1985. **28**(1): p. 15-20.
264. Saito, A., et al., *The antimicrobial activity of ciprofloxacin against Legionella species and the treatment of experimental Legionella pneumonia in guinea pigs*. J Antimicrob Chemother, 1986. **18**(2): p. 251-60.
265. Edelstein, P.H., *Review of azithromycin activity against Legionella spp*. Pathol Biol (Paris), 1995. **43**(6): p. 569-72.
266. Edelstein, P.H., et al., *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): p. 2204-9.
267. Denis, F. and M.C. Ploy, eds. *Bactériologie médicale. Techniques usuelles*. 2007.
268. Bonapace, C.R., et al., *Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002. **44**(4): p. 363-6.
269. Vilde, J.L., E. Dournon, and P. Rajagopalan, *Inhibition of Legionella pneumophila multiplication within human macrophages by antimicrobial agents*. Antimicrob Agents Chemother, 1986. **30**(5): p. 743-8.
270. Havlichek, D., L. Saravolatz, and D. Pohlod, *Effect of quinolones and other antimicrobial agents on cell-associated Legionella pneumophila*. Antimicrob Agents Chemother, 1987. **31**(10): p. 1529-34.
271. Blazquez Garrido, R.M., et al., *Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: levofloxacin versus macrolides*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(6): p. 800-6.
272. Falco, V., et al., *Treatment for Legionnaires' disease. Macrolides or quinolones?* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2006. **24**(6): p. 360-4.
273. Sabria, M., et al., *Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease*. Chest, 2005. **128**(3): p. 1401-5.
274. Griffin, A.T., et al., *Macrolides versus quinolones in Legionella pneumonia: results from the Community-Acquired Pneumonia Organization international study*. Int J Tuberc Lung Dis, 2010. **14**(4): p. 495-9.
275. Pedro-Botet, L. and V.L. Yu, *Legionella: macrolides or quinolones?* Clin Microbiol Infect, 2006. **12 Suppl 3**: p. 25-30.
276. Grau, S., et al., *Impact of rifampicin addition to clarithromycin in Legionella pneumophila pneumonia*. Int J Antimicrob Agents, 2006. **28**(3): p. 249-52.

277. Benito, J.R., et al., *Community-acquired pneumonia due to Legionella pneumophila serogroup 1. Study of 97 cases*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2003. **21**(8): p. 394-400.
278. Nakamura, S., et al., *The clinical efficacy of fluoroquinolone and macrolide combination therapy compared with single-agent therapy against community-acquired pneumonia caused by Legionella pneumophila*. *J Infect*, 2009. **59**(3): p. 222-4.
279. Rello, J., et al., *Community-acquired Legionella Pneumonia in the intensive care unit: Impact on survival of combined antibiotic therapy*. *Med Intensiva*, 2013. **37**(5): p. 320-6.
280. Kirst, H.A. and G.D. Sides, *New directions for macrolide antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989. **33**(9): p. 1419-22.
281. Kirst, H.A. and G.D. Sides, *New directions for macrolide antibiotics: structural modifications and in vitro activity*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989. **33**(9): p. 1413-8.
282. Tenson, T., M. Lovmar, and M. Ehrenberg, *The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome*. *J Mol Biol*, 2003. **330**(5): p. 1005-14.
283. Hansen, J.L., et al., *The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit*. *Mol Cell*, 2002. **10**(1): p. 117-28.
284. Schlunzen, F., et al., *Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria*. *Nature*, 2001. **413**(6858): p. 814-21.
285. Hansen, L.H., P. Mauvais, and S. Douthwaite, *The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA*. *Mol Microbiol*, 1999. **31**(2): p. 623-31.
286. Lebel, M., *Pharmacokinetic properties of clarithromycin: A comparison with erythromycin and azithromycin*. *Can J Infect Dis*, 1993. **4**(3): p. 148-52.
287. Patel, K.B., et al., *Comparison of bronchopulmonary pharmacokinetics of clarithromycin and azithromycin*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. **40**(10): p. 2375-9.
288. Blondeau, J.M., et al., *The macrolides*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002. **11**(2): p. 189-215.
289. Kohno, Y., et al., *Uptake of clarithromycin by rat lung cells*. *J Antimicrob Chemother*, 1990. **26**(4): p. 503-13.
290. Rapp, R.P., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral azithromycin: enhanced tissue activity and minimal drug interactions*. *Ann Pharmacother*, 1998. **32**(7-8): p. 785-93.
291. Gladue, R.P., et al., *In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989. **33**(3): p. 277-82.
292. Periti, P., et al., *Clinical pharmacokinetic properties of the macrolide antibiotics. Effects of age and various pathophysiological states (Part I)*. *Clin Pharmacokinet*, 1989. **16**(4): p. 193-214.
293. Van Hoogdalem, E.J., et al., *Multiple dose bioequivalence study with josamycin propionate, a drug with highly variable kinetics, in healthy volunteers*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1996. **34**(5): p. 202-7.
294. Brook, I., *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of spiramycin and their clinical significance*. *Clin Pharmacokinet*, 1998. **34**(4): p. 303-10.
295. Wildfeuer, A. and J.D. Lemme, *The pharmacokinetics of josamycin*. *Arzneimittelforschung*, 1985. **35**(3): p. 639-43.
296. Skinner, M. and I. Kanfer, *Comparative bioavailability of josamycin, a macrolide antibiotic, from a tablet and solution and the influence of dissolution on in vivo release*. *Biopharm Drug Dispos*, 1998. **19**(1): p. 21-9.
297. Tischendorf, G.W., H. Zeichhardt, and G. Stoffler, *Architecture of the Escherichia coli ribosome as determined by immune electron microscopy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(12): p. 4820-4.

298. Agrawal, R.K. and J. Frank, *Structural studies of the translational apparatus*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(2): p. 215-21.
299. Ban, N., et al., *The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution*. Science, 2000. **289**(5481): p. 905-20.
300. Steitz, T.A., *A structural understanding of the dynamic ribosome machine*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 242-53.
301. Worbs, M. and M.C. Wahl, *Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of bacterial and archaeal L4 ribosomal proteins*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000. **56**(Pt 5): p. 645-7.
302. Poehlsgaard, J. and S. Douthwaite, *The bacterial ribosome as a target for antibiotics*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(11): p. 870-81.
303. Vester, B. and S. Douthwaite, *Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(1): p. 1-12.
304. Poulsen, S.M., C. Kofoed, and B. Vester, *Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin*. J Mol Biol, 2000. **304**(3): p. 471-81.
305. Nissen, P., et al., *The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis*. Science, 2000. **289**(5481): p. 920-30.
306. Mankin, A.S., *Macrolide myths*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(5): p. 414-21.
307. Tenson, T. and A.S. Mankin, *Short peptides conferring resistance to macrolide antibiotics*. Peptides, 2001. **22**(10): p. 1661-8.
308. Douthwaite, S. and W.S. Champney, *Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site*. J Antimicrob Chemother, 2001. **48 Suppl T1**: p. 1-8.
309. Schlunzen, F., et al., *Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides*. Structure, 2003. **11**(3): p. 329-38.
310. Baltch, A.L., et al., *Antibacterial effect of telithromycin (HMR 3647) and comparative antibiotics against intracellular Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(1): p. 51-5.
311. Muller-Serieys, C., et al., *Bronchopulmonary disposition of the ketolide telithromycin (HMR 3647)*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(11): p. 3104-8.
312. Bornstein, N., C. Roudier, and J. Fleurette, *Determination of the activity on Legionella of eight macrolides and related agents by comparative testing on three media*. J Antimicrob Chemother, 1985. **15**(1): p. 17-22.
313. Edelstein, P.H. and M.A. Edelstein, *In vitro activity of quinupristin/dalfopristin (Synercid, RP 59500) against Legionella spp.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2000. **36**(1): p. 49-52.
314. Bebear, C. and D.H. Bouanchaud, *A review of the in-vitro activity of quinupristin/dalfopristin against intracellular pathogens and mycoplasmas*. J Antimicrob Chemother, 1997. **39 Suppl A**: p. 59-62.
315. Roberts, M.C., *Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **282**(2): p. 147-59.
316. Roberts, M.C., et al., *Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 2823-30.
317. Teodoro, C.R., et al., *Characterization of MLS(b) resistance among Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis isolates carrying different SCCmec types*. Microbiol Immunol, 2012. **56**(9): p. 647-50.
318. Desmolaize, B., et al., *Combinations of macrolide resistance determinants in field isolates of Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(9): p. 4128-33.
319. Cousin, S., Jr., W.L. Whittington, and M.C. Roberts, *Acquired macrolide resistance genes in pathogenic Neisseria spp. isolated between 1940 and 1987*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3877-80.

320. Roberts, M.C., et al., *Erythromycin-resistant Neisseria gonorrhoeae and oral commensal Neisseria spp. carry known rRNA methylase genes*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(6): p. 1367-72.
321. Roberts, M.C., O.O. Soge, and D.B. No, *Characterization of macrolide resistance genes in Haemophilus influenzae isolated from children with cystic fibrosis*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(1): p. 100-4.
322. Mayrhofer, S., et al., *Antibiotic susceptibility of members of the Lactobacillus acidophilus group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants*. Int J Food Microbiol, 2010. **144**(1): p. 81-7.
323. Nash, K.A., et al., *Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3476-8.
324. Andini, N. and K.A. Nash, *Intrinsic macrolide resistance of the Mycobacterium tuberculosis complex is inducible*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(7): p. 2560-2.
325. Buriankova, K., et al., *Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1): p. 143-50.
326. Weisblum, B., *Erythromycin resistance by ribosome modification*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(3): p. 577-85.
327. Liu, M. and S. Douthwaite, *Activity of the ketolide telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(6): p. 1629-33.
328. Prunier, A.L., et al., *Clinical isolates of Staphylococcus aureus with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(9): p. 3054-6.
329. Pihlajamaki, M., et al., *Ribosomal mutations in Streptococcus pneumoniae clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(3): p. 654-8.
330. Davies, T.A., et al., *Predominance of 23S rRNA mutants among non-erm, non-mef macrolide-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae collected in the United States in 1999-2000*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 3031-3.
331. Versalovic, J., et al., *Point mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori associated with different levels of clarithromycin resistance*. J Antimicrob Chemother, 1997. **40**(2): p. 283-6.
332. Occhialini, A., et al., *Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(12): p. 2724-8.
333. Liu, Y., et al., *Characterization of macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae isolated from children in Shanghai, China*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **67**(4): p. 355-8.
334. Lin, C., et al., *Nested PCR-linked capillary electrophoresis and single-strand conformation polymorphisms for detection of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae in Beijing, China*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(12): p. 4567-72.
335. Cao, B., et al., *High prevalence of macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(2): p. 189-94.
336. Matsuoka, M., et al., *Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae clinical isolates obtained in Japan*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(12): p. 4624-30.
337. Tait-Kamradt, A., et al., *Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(8): p. 2118-25.
338. Gestin, B., et al., *Phenotypic and genetic characterization of macrolide resistance in Francisella tularensis subsp. holarctica biovar I*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(11): p. 2359-67.

339. Pereyre, S., et al., *Characterisation of in vitro-selected mutants of Ureaplasma parvum resistant to macrolides and related antibiotics*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **29**(2): p. 207-11.
340. Ladely, S.R., et al., *23S rRNA gene mutations contributing to macrolide resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. Foodborne Pathog Dis, 2009. **6**(1): p. 91-8.
341. Canu, A., et al., *Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(1): p. 125-31.
342. Farrell, D.J., et al., *In vitro activities of telithromycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against Streptococcus pneumoniae with macrolide resistance due to ribosomal mutations*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8): p. 3169-71.
343. Xiong, L., et al., *A ketolide resistance mutation in domain II of 23S rRNA reveals the proximity of hairpin 35 to the peptidyl transferase centre*. Mol Microbiol, 1999. **31**(2): p. 633-9.
344. Pereyre, S., et al., *Emergence of a 23S rRNA mutation in Mycoplasma hominis associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(4): p. 753-6.
345. Ettayebi, M., S.M. Prasad, and E.A. Morgan, *Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1985. **162**(2): p. 551-7.
346. Ishida, N., et al., *Antimicrobial susceptibilities of Propionibacterium acnes isolated from patients with acne vulgaris*. Microbiol Immunol, 2008. **52**(12): p. 621-4.
347. Biswas, S., D. Raoult, and J.M. Rolain, *Molecular mechanisms of resistance to antibiotics in Bartonella bacilliformis*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(6): p. 1065-70.
348. Biswas, S., et al., *Molecular mechanisms of Bartonella henselae resistance to azithromycin, pradofloxacin and enrofloxacin*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(3): p. 581-2.
349. Biswas, S., D. Raoult, and J.M. Rolain, *Molecular characterization of resistance to macrolides in Bartonella henselae*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(9): p. 3192-3.
350. Bartkus, J.M., et al., *Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in Bordetella pertussis: implications for surveillance of antimicrobial resistance*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(3): p. 1167-72.
351. Cassidy, P.K., et al., *Co-infection with two different strains of Bordetella pertussis in an infant*. J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 3): p. 388-91.
352. Guillot, S., et al., *Macrolide-resistant Bordetella pertussis infection in newborn girl, France*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(6): p. 966-8.
353. Misyurina, O.Y., et al., *Mutations in a 23S rRNA gene of Chlamydia trachomatis associated with resistance to macrolides*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(4): p. 1347-9.
354. Binet, R. and A.T. Maurelli, *Frequency of development and associated physiological cost of azithromycin resistance in Chlamydia psittaci 6BC and C. trachomatis L2*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(12): p. 4267-75.
355. Clark, C., et al., *In vitro selection of resistance in Haemophilus influenzae by amoxicillin-clavulanate, cefpodoxime, cefprozil, azithromycin, and clarithromycin*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(9): p. 2956-62.
356. Peric, M., et al., *Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of Haemophilus influenzae clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(3): p. 1017-22.
357. Wang, G. and D.E. Taylor, *Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(8): p. 1952-8.

358. Alfaresi, M.S. and A.A. Elkoush, *Characterization of clarithromycin resistance in isolates of Helicobacter pylori from the UAE*. Indian J Gastroenterol, 2010. **29**(3): p. 116-20.
359. Drago, L., et al., *Macrolide resistance and in vitro selection of resistance to antibiotics in Lactobacillus isolates*. J Microbiol, 2011. **49**(4): p. 651-6.
360. Begovic, J., et al., *Human vaginal Lactobacillus rhamnosus harbor mutation in 23S rRNA associated with erythromycin resistance*. Res Microbiol, 2009. **160**(6): p. 421-6.
361. Wallace, R.J., Jr., et al., *Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(7): p. 1676-81.
362. Inagaki, T., et al., *Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin resistance genes in Mycobacterium avium complex isolates*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(4): p. 722-9.
363. Thiermann, S., J. Munzinger, and T. Bodmer, *Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of clarithromycin resistance in Mycobacterium avium*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(4): p. 679-81.
364. Jamal, M.A., et al., *Molecular basis of clarithromycin-resistance in Mycobacterium avium intracellulare complex*. Tuber Lung Dis, 2000. **80**(1): p. 1-4.
365. Burman, W.J., et al., *AIDS-related Mycobacterium kansasii infection with initial resistance to clarithromycin*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1998. **31**(2): p. 369-71.
366. Li, B.B., et al., *Single and dual mutations at positions 2058, 2503 and 2504 of 23S rRNA and their relationship to resistance to antibiotics that target the large ribosomal subunit*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(9): p. 1983-6.
367. Jensen, J.S., et al., *Azithromycin treatment failure in Mycoplasma genitalium-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(12): p. 1546-53.
368. Li, X., et al., *Emerging macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae in children: detection and characterization of resistant isolates*. Pediatr Infect Dis J, 2009. **28**(8): p. 693-6.
369. Liu, Y., et al., *Antimicrobial susceptibility of Mycoplasma pneumoniae isolates and molecular analysis of macrolide-resistant strains from Shanghai, China*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(5): p. 2160-2.
370. Ross, J.I., et al., *Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant Propionibacterium acnes isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia*. Br J Dermatol, 2001. **144**(2): p. 339-46.
371. Farrell, D.J., et al., *Macrolide resistance by ribosomal mutation in clinical isolates of Streptococcus pneumoniae from the PROTEKT 1999-2000 study*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(6): p. 1777-83.
372. Jalava, J., M. Vaara, and P. Huovinen, *Mutation at the position 2058 of the 23S rRNA as a cause of macrolide resistance in Streptococcus pyogenes*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2004. **3**: p. 5.
373. Xiao, L., et al., *Mutations in ribosomal proteins and ribosomal RNA confer macrolide resistance in human Ureaplasma spp.* Int J Antimicrob Agents, 2011. **37**(4): p. 377-9.
374. Lee, S.Y., Y. Ning, and J.C. Fenno, *23S rRNA point mutation associated with erythromycin resistance in Treponema denticola*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **207**(1): p. 39-42.
375. Stamm, L.V. and H.L. Bergen, *A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant Treponema pallidum clinical isolate*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(3): p. 806-7.
376. Lehtopolku, M., et al., *Ribosomal mutations as the main cause of macrolide resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(12): p. 5939-41.
377. Shimada, Y., et al., *Macrolide resistance-associated 23S rRNA mutation in Mycoplasma genitalium, Japan*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(6): p. 1148-50.

378. Okazaki, N., et al., *Characteristics of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro*. Microbiol Immunol, 2001. **45**(8): p. 617-20.
379. Chisholm, S.A., J. Dave, and C.A. Ison, *High-level azithromycin resistance occurs in Neisseria gonorrhoeae as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(9): p. 3812-6.
380. Galarza, P.G., et al., *New mutation in 23S rRNA gene associated with high level of azithromycin resistance in Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(4): p. 1652-3.
381. Furneri, P.M., et al., *Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16-membered macrolide antibiotics in mutant strains of Mycoplasma hominis*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(10): p. 2958-60.
382. Pereyre, S., et al., *In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(2): p. 460-5.
383. Garza-Ramos, G., et al., *Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA*. J Bacteriol, 2001. **183**(23): p. 6898-907.
384. Rimbara, E., et al., *Novel mutation in 23S rRNA that confers low-level resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(9): p. 3465-6.
385. Ng, L.K., et al., *Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(9): p. 3020-5.
386. Pereyre, S., et al., *Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in Mycoplasma hominis and Mycoplasma fermentans and for acquired resistance to macrolides in M. hominis*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(10): p. 3142-50.
387. Ross, J.I., et al., *Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(5): p. 1162-5.
388. Kim, J.M., et al., *Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori strains isolated from Korean patients*. J Microbiol Biotechnol, 2008. **18**(9): p. 1584-9.
389. Toracchio, S., et al., *Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in Helicobacter pylori*. Helicobacter, 2004. **9**(5): p. 396-9.
390. Fontana, C., et al., *New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of Helicobacter pylori clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(12): p. 3765-9.
391. Hao, Q., et al., *New mutation points in 23S rRNA gene associated with Helicobacter pylori resistance to clarithromycin in northeast China*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(7): p. 1075-7.
392. Garrido, L. and H. Toledo, *Novel genotypes in Helicobacter pylori involving domain V of the 23S rRNA gene*. Helicobacter, 2007. **12**(5): p. 505-9.
393. Gerchman, I., et al., *Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of Mycoplasma gallisepticum strains isolated from poultry*. Vet Res, 2011. **42**(1): p. 90.
394. Wu, C.M., et al., *Induction of macrolide resistance in Mycoplasma gallisepticum in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **247**(2): p. 199-205.
395. Vacher, S., et al., *Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic Campylobacter spp. by real-time PCR*. Microb Drug Resist, 2005. **11**(1): p. 40-7.
396. Novotny, G.W., et al., *Ketolide antimicrobial activity persists after disruption of interactions with domain II of 23S rRNA*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(10): p. 3677-83.

397. Canu, A., et al., *Denaturing high-performance liquid chromatography detection of ribosomal mutations conferring macrolide resistance in gram-positive cocci*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(1): p. 297-304.
398. Douthwaite, S., et al., *Defining the structural requirements for a helix in 23 S ribosomal RNA that confers erythromycin resistance*. *J Mol Biol*, 1989. **209**(4): p. 655-65.
399. Gregory, S.T. and A.E. Dahlberg, *Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA*. *J Mol Biol*, 1999. **289**(4): p. 827-34.
400. Diner, E.J. and C.S. Hayes, *Recombineering reveals a diverse collection of ribosomal proteins L4 and L22 that confer resistance to macrolide antibiotics*. *J Mol Biol*, 2009. **386**(2): p. 300-15.
401. Wittmann, H.G., et al., *Biochemical and genetic studies on two different types of erythromycin resistant mutants of Escherichia coli with altered ribosomal proteins*. *Mol Gen Genet*, 1973. **127**(2): p. 175-89.
402. Davydova, N., et al., *L22 ribosomal protein and effect of its mutation on ribosome resistance to erythromycin*. *J Mol Biol*, 2002. **322**(3): p. 635-44.
403. Pardo, D. and R. Rosset, *Properties of ribosomes from erythromycin resistant mutants of Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1977. **156**(3): p. 267-71.
404. Rolain, J.M. and D. Raoult, *Prediction of resistance to erythromycin in the genus Rickettsia by mutations in L22 ribosomal protein*. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **56**(2): p. 396-8.
405. Kobayashi, H., et al., *Macrolides and lincomycin susceptibility of Mycoplasma hyorhinis and variable mutation of domain II and V in 23S ribosomal RNA*. *J Vet Med Sci*, 2005. **67**(8): p. 795-800.
406. Caldwell, D.B., Y. Wang, and J. Lin, *Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(11): p. 3947-54.
407. Meghari, S., et al., *Antiangiogenic effect of erythromycin: an in vitro model of Bartonella quintana infection*. *J Infect Dis*, 2006. **193**(3): p. 380-6.
408. Cagliero, C., et al., *Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(11): p. 3893-6.
409. Zhu, H., et al., *Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in Chlamydia trachomatis strains selected in vitro by macrolide passage*. *Andrologia*, 2010. **42**(4): p. 274-80.
410. Chittum, H.S. and W.S. Champney, *Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1994. **176**(20): p. 6192-8.
411. Prunier, A.L., et al., *Mutation of L4 ribosomal protein conferring unusual macrolide resistance in two independent clinical isolates of Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist*, 2005. **11**(1): p. 18-20.
412. Tait-Kamradt, A., et al., *Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of Streptococcus pneumoniae from Eastern Europe and North America*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(12): p. 3395-401.
413. Nagai, K., et al., *Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 Pneumococci from 10 central and Eastern European countries*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(2): p. 371-7.
414. Reinert, R.R., et al., *Ribosomal mutations conferring resistance to macrolides in Streptococcus pneumoniae clinical strains isolated in Germany*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(7): p. 2319-22.
415. Malbruny, B., et al., *Resistance to macrolides in clinical isolates of Streptococcus pyogenes due to ribosomal mutations*. *J Antimicrob Chemother*, 2002. **49**(6): p. 935-9.

416. Bingen, E., et al., *Emergence of group A Streptococcus strains with different mechanisms of macrolide resistance*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(5): p. 1199-203.
417. Malbruny, B., et al., *Resistance to quinupristin-dalfopristin due to mutation of L22 ribosomal protein in Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(7): p. 2200-7.
418. Achour, W., et al., *Phenotypic and molecular characterization of macrolide and streptogramin resistance in Streptococcus mitis from neutropenic patients*. *J Antimicrob Chemother*, 2004. **54**(1): p. 117-21.
419. Musher, D.M., et al., *Emergence of macrolide resistance during treatment of pneumococcal pneumonia*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(8): p. 630-1.
420. Webber, M.A. and L.J. Piddock, *The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance*. *J Antimicrob Chemother*, 2003. **51**(1): p. 9-11.
421. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*. *Drugs*, 2004. **64**(2): p. 159-204.
422. Piddock, L.J., *Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance*. *Nat Rev Microbiol*, 2006. **4**(8): p. 629-36.
423. Schwaiger, K., C. Holzel, and J. Bauer, *Detection of the macrolide-efflux protein A gene mef(A) in Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist*, 2011. **17**(3): p. 429-32.
424. Nunez-Samudio, V. and O. Chesneau, *Functional interplay between the ATP binding cassette Msr(D) protein and the membrane facilitator superfamily Mef(E) transporter for macrolide resistance in Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 2013. **164**(3): p. 226-35.
425. Del Grosso, M., et al., *Genetic resistance elements carrying mef subclasses other than mef(A) in Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(7): p. 3226-30.
426. Iovine, N.M., *Resistance mechanisms in Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 2013. **4**(3): p. 230-40.
427. Kurincic, M., et al., *Mechanisms of erythromycin resistance of Campylobacter spp. isolated from food, animals and humans*. *Int J Food Microbiol*, 2007. **120**(1-2): p. 186-90.
428. Liu, Z.Q., P.Y. Zheng, and P.C. Yang, *Efflux pump gene hefA of Helicobacter pylori plays an important role in multidrug resistance*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(33): p. 5217-22.
429. Cousin, S.L., Jr., W.L. Whittington, and M.C. Roberts, *Acquired macrolide resistance genes and the 1 bp deletion in the mtrR promoter in Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*, 2003. **51**(1): p. 131-3.
430. Gibreel, A., N.M. Wetsch, and D.E. Taylor, *Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(9): p. 3212-6.
431. Chesneau, O., K. Tsvetkova, and P. Courvalin, *Resistance phenotypes conferred by macrolide phosphotransferases*. *FEMS Microbiol Lett*, 2007. **269**(2): p. 317-22.
432. Bogdanovich, T., B. Bozdogan, and P.C. Appelbaum, *Effect of efflux on telithromycin and macrolide susceptibility in Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(3): p. 893-8.
433. Corcoran, D., et al., *An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in Campylobacter*. *Int J Antimicrob Agents*, 2006. **27**(1): p. 40-5.
434. Miller, M.L., R. Hayden, and A. Gaur, *Legionella bozemanii pulmonary abscess in a pediatric allogeneic stem cell transplant recipient*. *Pediatr Infect Dis J*, 2007. **26**(8): p. 760-2.
435. Schindel, C., et al., *Persistent Legionella infection in a patient after bone marrow transplantation*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(11): p. 4294-5.
436. Gaia, V., et al., *Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(5): p. 2047-52.

437. Ratzow, S., et al., *Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminase cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing Legionella pneumophila serogroup 1 strains.* J Clin Microbiol, 2007. **45**(6): p. 1965-8.
438. Murdoch, D.R., 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): p. 1275-81.
439. Descours, G., et al., *Rifampicin-macrolide synergy against Legionella pneumophila serogroup 1 in human macrophages using a quantitative real-time PCR assay.* Int J Antimicrob Agents, 2011. **38**(2): p. 188-9.
440. Edelstein, P.H. and S.M. Finegold, *Use of a semiselective medium to culture Legionella pneumophila from contaminated lung specimens.* J Clin Microbiol, 1979. **10**(2): p. 141-3.
441. Edelstein, P.H., *Comparative study of selective media for isolation of Legionella pneumophila from potable water.* J Clin Microbiol, 1982. **16**(4): p. 697-9.
442. Luck, P.C., et al., *Comparison of commercially available media for the recovery of Legionella species.* Int J Hyg Environ Health, 2004. **207**(6): p. 589-93.
443. Ta, A.C., et al., *Comparison of culture methods for monitoring Legionella species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods.* J Clin Microbiol, 1995. **33**(8): p. 2118-23.
444. Leoni, E. and P.P. Legnani, *Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of Legionella species from hot water systems.* J Appl Microbiol, 2001. **90**(1): p. 27-33.
445. Conza, L., S. Casati, and V. Gaia, *Detection limits of Legionella pneumophila in environmental samples after co-culture with Acanthamoeba polyphaga.* BMC Microbiol, 2013. **13**: p. 49.
446. Albers, U., et al., *The amoebae plate test implicates a paralogue of lpxB in the interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii.* Microbiology, 2005. **151**(Pt 1): p. 167-82.
447. Bruin, J.P., et al., *First isolation of ciprofloxacin-resistant Legionella pneumophila.* 2013: The 8th international conference on Legionella, Melbourne.
448. Bebear, C., S. Pereyre, and O. Peuchant, *Mycoplasma pneumoniae: susceptibility and resistance to antibiotics.* Future Microbiol, 2011. **6**(4): p. 423-31.
449. Pringle, M., et al., *Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in Brachyspira spp. isolates.* Mol Microbiol, 2004. **54**(5): p. 1295-306.
450. Bosling, J., et al., *Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein L3.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(9): p. 2892-6.
451. de Almeida, L.M., et al., *Linezolid resistance in Brazilian Staphylococcus hominis strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations.* Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(8): p. 4082-3.
452. Locke, J.B., M. Hilgers, and K.J. Shaw, *Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(12): p. 5275-8.
453. Long, K.S. and B. Vester, *Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome.* Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(2): p. 603-12.
454. Ferhat, M., et al., *The TolC protein of Legionella pneumophila plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion.* PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7732.
455. Muskhelishvili, G. and A. Travers, *Transcription factor as a topological homeostat.* Front Biosci, 2003. **8**: p. d279-85.
456. Labandeira-Rey, M., et al., *The Haemophilus ducreyi Fis Protein Is Involved in Controlling Expression of the IspB-IspA2 Operon and Other Virulence Factors.* Infect Immun, 2013. **81**(11): p. 4160-70.

457. Wang, H., et al., *Genome-wide analysis of the Salmonella fis regulon and its regulatory mechanism on pathogenicity islands*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64688.
458. Steen, J.A., et al., *Fis is essential for capsule production in Pasteurella multocida and regulates expression of other important virulence factors*. PLoS Pathog, 2010. **6**(2): p. e1000750.
459. Cameron, A.D. and C.J. Dorman, *A fundamental regulatory mechanism operating through OmpR and DNA topology controls expression of Salmonella pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002615.
460. Hansen, S., K. Lewis, and M. Vulic, *Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(8): p. 2718-26.