



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE : **2010**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 28 janvier 2010

Pour obtenir

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Camille FANJEAUX

Née le 18 février 1986

***LEGIONELLA* ET *LEGIONELLOSE* :**
EVOLUTION DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES EN
FRANCE
DE 1987 A 2008

JURY

Président : GANTZER Christophe, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy
Juges : MATHIEU Laurence, Maître de conférences, EPHE, Nancy
BERTRAND Isabelle, Maître de conférences, Université Henri Poincaré, Nancy
RICHARD Benoît, pharmacien d'officine, Tronville-en-Barrois

Liste du personnel enseignant-chercheur

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine : Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement : Jean-Michel SIMON
Pharmaceutique Hospitalier

DOYEN HONORAIRE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Marie-Madeleine GALTEAU
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Gérald CATAU
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER
Alain BAGREL
Jean-Claude BLOCK
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON
Chantal FINANCE
Pascale FRIANT-MICHEL
Christophe GANTZER
Max HENRY
Jean-Yves JOUZEAU
Pierre LABRUDE
domicile
Isabelle LARTAUD
Dominique LAURAIN-MATTAR
Brigitte LEININGER-MULLER
Pierre LEROY
Philippe MAINCENT
Alain MARSURA
Patrick MENU
Jean-Louis MERLIN
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Bertrand RIHN
Jean-Michel SIMON
pharmaceutique

Pharmacie clinique
Biochimie
Santé publique
Pharmacologie cardiovasculaire
Virologie, Immunologie
Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Microbiologie environnementale
Botanique, Mycologie
Bioanalyse du médicament
Physiologie, Orthopédie, Maintien à

Pharmacologie cardiovasculaire
Pharmacognosie
Biochimie
Chimie physique générale
Pharmacie galénique
Chimie thérapeutique
Physiologie
Biologie cellulaire oncologique
Chimie thérapeutique
Biochimie, Biologie moléculaire
Economie de la santé, législation

MAITRES DE CONFÉRENCES

Monique ALBERT
Sandrine BANAS
Marianne BEAUD
Emmanuelle BENOIT
Isabelle BERTRAND
Michel BOISBRUN
François BONNEAUX
Ariane BOUDIER
Cédric BOURA
Jean-Claude CHEVIN
Igor CLAROT
Jocelyne COLLOMB
Joël COULON
Sébastien DADE
Dominique DECOLIN
Béatrice DEMORE
Joël DUCOURNEAU
Florence DUMARCAZ
François DUPUIS
Raphaël DUVAL
Béatrice FAIVRE

Bactériologie, Virologie
Parasitologie
Biologie cellulaire
Communication et santé
Microbiologie environnementale
Chimie thérapeutique
Chimie thérapeutique
Chimie Physique
Physiologie
Chimie générale et minérale
Chimie analytique
Parasitologie, Mycologie
Biochimie
Bio-informatique
Chimie analytique
Pharmacie clinique
Biophysique, audioprothèse, acoustique
Chimie thérapeutique
Pharmacologie
Microbiologie clinique
Hématologie

Adel FAIZ
Luc FERRARI
Stéphane GIBAUD
Thierry HUMBERT
Frédéric JORAND
Olivier JOUBERT
Francine KEDZIEREWICZ
Alexandrine LAMBERT
Faten MERHI-SOUSSI
Christophe MERLIN
moléculaire
Blandine MOREAU
Maxime MOURER
Francine PAULUS
Christine PERDICAKIS
Caroline PERRIN-SARRADO
Virginie PICHON
Anne SAPIN
Marie-Paule SAUDER
Nathalie THILLY
Gabriel TROCKLE
Marie-Noëlle VAULTIER
Mohamed ZAIYOU
Colette ZINUTTI

Biophysique-accoustique
Toxicologie
Pharmacie clinique
Chimie organique
Santé et environnement
Toxicologie, sécurité sanitaire
Pharmacie galénique
Informatique, Biostatistiques
Hématologie biologique
Microbiologie environnementale et

Pharmacognosie
Pharmacochimie supramoléculaire
Informatique
Chimie organique
Pharmacologie
Biophysique
Pharmacie galénique
Mycologie, Botanique
Santé publique
Pharmacologie
Biodiversité végétale et fongique
Biochimie et Biologie moléculaire
Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER

Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD

Anglais

ASSISTANT

Annie PAVIS

Bactériologie

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET

Directeur

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS
DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A
LEUR AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.



Remerciements

Au jury de thèse,

A **Christophe GANTZER**,

qui me fait l'honneur de présider cette thèse et pour qui j'ai la plus grande admiration et un profond respect,

pour son écoute attentive et ses conseils précieux tout au long de mon cursus universitaire.

A **Laurence MATHIEU**,

qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse.

Un grand merci pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire ainsi que pour ta gentillesse et la grande aide que tu m'as apportée durant la rédaction de ce travail.

A **Benoît RICHARD**,

qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je tiens également à le remercier lui et son père pour la très grande gentillesse dont ils ont fait preuve lorsqu'ils m'ont accueillie dans leur officine.

A **Isabelle BERTRAND**,

qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Mes remerciements vont également

A **Angéline, Sidonie, Stéphanie**,

pour leur amitié, leur bonne humeur et nos fous rires qui m'ont permis d'apprécier d'autant plus ces six années passées à la fac.

A **Christelle, Edith, Florence, Hélène, Isabelle, Julien, Laetitia, Sandra, Sébastien**,

pour leur gentillesse, leur accueil chaleureux, leur soutien durant mon stage de sixième année.

A **Pierre-André**

pour sa patience et son soutien durant les « quelques » périodes de stress qui ont accompagné ces six années d'études.

Et plus que tout un grand merci à **mes parents**, mon frère **Nicolas** et mes soeurs, **Fanny et Amandine**

qui n'ont cessé d'être présents tout au long de mon cursus, qui ont respecté et m'ont soutenue dans mes choix. Je leur dois beaucoup.

Table des matières

Partie I : Etat de l'art

1. Caractéristiques générales de la bactérie.....	3
1.1. Classification.....	3
1.2. Morphologie.....	6
1.3. Caractéristiques biochimiques et enzymatiques.....	7
1.4. Caractéristiques culturelles.....	8
1.5. L'état viable non cultivable (VBNC).....	9
1.6. Facteurs de virulence.....	11
1.6.1. Le système dot/icm.....	11
1.6.2. Les protéines MOMP.....	11
1.6.3. La protéine Mip.....	12
1.6.4. La protéine chaperonne Hps60.....	12
1.6.5. Les pili.....	13
1.6.6. Les flagelles.....	13
1.6.7. Les lipopolysaccharides (LPS).....	13
1.6.8. Systèmes de sécrétion.....	14
1.6.9. Autres facteurs de virulence.....	14
2. Écologie des légionelles.....	15
2.1. Les réservoirs de <i>Legionella</i>	15
2.1.1. Réservoirs naturels.....	15
2.1.1.1. Les milieux hydriques.....	15
2.1.1.2. Les sols et composts.....	16
2.1.2. Réservoirs artificiels : les systèmes hydriques.....	16
2.1.2.1. Les systèmes de distribution d'eau potable.....	16
2.1.2.2. Tours aérorefrigérantes.....	18
2.1.2.3. Autres installations.....	19
2.2. Survie de <i>Legionella</i> dans l'environnement.....	20
2.2.1. Facteurs influençant la survie de <i>Legionella</i> dans l'eau.....	20
2.2.1.1. Température.....	21
2.2.1.2. Teneur en oxygène dissous.....	22
2.2.1.3. pH.....	23
2.2.1.4. Salinité.....	24
2.2.1.5. Rayonnement solaire.....	24
2.2.1.6. Présence de minéraux.....	25
2.2.2. Survie dans l'air.....	25

2.2.2.1.	Phase de croissance de la bactérie	27
2.2.2.2.	Humidité	28
2.2.2.3.	Oxydants de l'air.....	28
2.2.2.4.	Rayonnements solaires	28
2.2.3.	Survie dans les biofilms	29
2.3.	Interactions avec d'autres espèces bactériennes	30
2.3.1.	Inhibition.....	30
2.3.1.1.	Inhibition par bactéricidie.....	31
2.3.1.2.	Parasitisme.....	32
2.3.2.	Potentialisation.....	32
2.4.	Interactions avec des espèces eucaryotes	33
2.4.1.	Amibes	34
2.4.2.	Protozoaires ciliés	37
3.	La voie de transmission	38
3.1.	Mode de transmission.....	38
3.2.	Les relations dose-effet et dose-réponse.....	39
3.2.1.	Définition	39
3.2.2.	Données disponibles pour <i>Legionella</i>	41
3.2.2.1.	Etudes sur l'animal	41
3.2.2.2.	Extrapolation des données à l'homme	43
4.	Pathogénicité	45
4.1.	Les cellules hôtes.....	45
4.2.	Le cycle de réplication intracellulaire	46
4.2.1.	L'adhésion des légionelles aux cellules hôtes et leur pénétration	46
4.2.2.	La multiplication intracellulaire.....	47
4.2.3.	La lyse de la cellule hôte et le relargage des bactéries.....	47
4.3.	Les différentes formes de légionellose	49
4.3.1.	Maladie du légionnaire.....	49
4.3.1.1.	Signes cliniques	49
4.3.1.2.	Facteurs de risque	49
4.3.2.	Fièvre de Pontiac.....	50
4.3.2.1.	Signes cliniques	50
4.3.2.2.	Facteurs de risque	51
4.4.	Diagnostic de la maladie du légionnaire	51
4.4.1.	Types de prélèvements	51
4.4.2.	Techniques utilisées	51
4.4.2.1.	Recherche d'antigènes solubles urinaires (antigénurie).....	51
4.4.2.2.	Culture	52
4.4.2.3.	Immunofluorescence directe (IFD).....	52
4.4.2.4.	Sérologie	53
4.4.2.5.	Amplification génique	53
4.5.	Traitement de la maladie du légionnaire	55

5.	Surveillance des légionelloses et de <i>Legionella</i> en France	57
5.1.	Surveillance épidémiologique	57
5.1.1.	Notifications et signalements obligatoires de la maladie du légionnaire	57
5.1.2.	Signalements obligatoires des infections nosocomiales	57
5.1.3.	Notifications du Centre National de Référence	58
5.1.4.	Notifications du réseau européen	59
5.2.	Surveillance environnementale	59
6.	Gestion du risque <i>Legionella</i>	61
6.1.	Prévention	61
6.2.	Traitement	62
6.2.1.	Traitement thermique	63
6.2.2.	Chloration	64

Partie II : Evolution des données épidémiologiques en France de 1987 à 2008 .. 67

1.	Nombre de cas déclarés	68
1.1.	Définition	68
1.2.	Evolution temporelle des cas déclarés	69
1.2.1.	Augmentation du nombre de cas de maladie du légionnaire entre 1997 et 2005	69
1.2.2.	Diminution du nombre de cas de maladie du légionnaire entre 2005 et 2008	73
2.	Age moyen des patients	74
3.	Sexe ratio	76
4.	Létalité	80
5.	Caractéristiques phénotypiques des souches	81
6.	Caractéristiques génotypiques des souches	85
7.	Expositions à risque	87
8.	Sources de contamination	89
	Conclusion	92
	Glossaire	93
	Annexe	95
	Bibliographie	97

Table des figures

Figure 1 : Hôtel Bellevue-Stratford (Philadelphie, USA)	3
Figure 2 : Résultats de l'analyse phylogénétique basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S de chaque espèce de <i>Legionella</i> et des LLAP.....	6
Figure 3 : Zone de mobilité par « twitching » observée chez <i>L. pneumophila</i> après 96 h de culture à 37°C sur gélose BYE- α	7
Figure 4 : Culture de <i>L. pneumophila</i> sur gélose BCYE- α	9
Figure 5 : Schéma d'une TAR par voie humide.....	18
Figure 6 : Représentation schématique du comportement de <i>Legionella</i> en fonction de la température.....	22
Figure 7 : Effet des conditions aérobies et anaérobies sur la croissance de <i>Legionella pneumophila</i> dans une eau à 35°C.....	22
Figure 8 : Effet du pH sur la survie de <i>Legionella</i> en microcosme constitué d'eau de source chaude (42°C) : pH 2 (a), pH 5 (b), pH 6 (c), pH 8 (d), pH 10 (e).....	24
Figure 9 : Comparaison de la survie dans l'air de <i>L. pneumophila</i> sg 1 (\blacktriangle), <i>L. micdadei</i> (\blacksquare) et <i>L. bozemanii</i> (\circ) à 60 % d'humidité relative et 20°C.....	27
Figure 10 : Cycle de vie du biofilm.....	30
Figure 11 : Dernier stade de la multiplication de <i>Legionella pneumophila</i> dans l'amibe <i>A. polyphaga</i>	34
Figure 12 : Image en microscopie électronique de <i>Dictyostelium Discoideum</i>	35
Figure 13 : Phagocytose par enroulement de <i>Legionella pneumophila</i> par <i>A. castellanii</i>	35
Figure 14 : Schéma d'infection d'une amibe par <i>Legionella</i>	37
Figure 15 : Schéma des voies de transmission de l'environnement à l'homme de <i>Legionella</i>	39
Figure 16 : Schéma simplifié de l'appareil pulmonaire et des bronchioles.....	45
Figure 17 : Cycle intra-cellulaire de <i>Legionella</i> dans le macrophage.....	47
Figure 18 : Transformation phénotypique observée lors de la multiplication intracellulaire de <i>Legionella pneumophila</i>	48
Figure 19 : Schéma de la recommandation de l'InVS concernant la conduite à tenir pour le diagnostic de la maladie du légionnaire.....	55
Figure 20 : Organisation de la collecte des données des cas de maladie du légionnaire en France.....	59
Figure 21 : Courbe de répartition du chlore en fonction du pH.....	64
Figure 22 : Courbe représentative du nombre de cas de maladie du légionnaire déclarés en France de 1988 à 2008.....	69
Figure 23 : Répartition annuelle des méthodes de diagnostic des cas de maladie du légionnaire survenus en France de 1997 à 2008.....	71
Figure 24 : Évaluation de la réactivité des signalements à la DDASS entre 1998 et 2006.....	72
Figure 25 : Représentation de l'incidence (nombre de sujets atteints pour 100 000 individus) par sexe et classe d'âge des cas de maladie du légionnaire survenus en France entre 1998 et 2008.....	75
Figure 26 : Représentation graphique de l'évolution de l'âge moyen des patients atteints de la maladie du légionnaire entre 1987 et 2008.....	76
Figure 27 : Représentation graphique de l'évolution, sur la période 1996 - 2008, de la proportion des patients chez lesquels ont été retrouvés les différents facteurs prédisposants.....	78
Figure 28 : Évolution des proportions de fumeurs et de fumeurs réguliers en France de 1950 à 2000.....	79
Figure 29 : Représentation de l'évolution de la létalité de la maladie du légionnaire en parallèle du nombre de cas déclarés entre 1997 et 2008.....	81
Figure 30 : Évolution du pourcentage de <i>Legionella pneumophila</i> (Lp) et de <i>Legionella pneumophila</i> sg 1 (Lp sg1) parmi les cas de maladie du légionnaire pour lesquels l'espèce et le sérotype de la bactérie sont connus.....	83
Figure 31 : Représentation de l'évolution du pourcentage d'isolements de bactéries parmi les cas de maladie du légionnaire diagnostiqués en France de 2000 à 2008 et des proportions de <i>Legionella pneumophila</i> (Lp) et <i>Legionella pneumophila</i> sg 1 (Lp sg1) parmi ces isolements.....	84
Figure 32 : Évolution des souches endémiques de <i>Legionella pneumophila</i> sg 1 en France de 1995 à 2008.....	87
Figure 33 : Représentation de l'évolution des expositions à risque répertoriées chez les patients atteints de la maladie du légionnaire de 1996 à 2008.....	88

Table des tableaux

Tableau 1 : Espèces et sérogroupes du genre <i>Legionella</i>	4
Tableau 2 : Exemples de conditions induisant l'état VBNC chez <i>Legionella</i>	10
Tableau 3 : Présence de <i>Legionella</i> dans les réservoirs et systèmes de distribution d'eau potable.	17
Tableau 4 : Concentrations en <i>Legionella</i> retrouvées dans les TAR lors d'épidémies.....	19
Tableau 5 : Concentrations en légionelles dans l'air par différentes techniques d'analyses.	26
Tableau 6 : Bactéries capables d'inhiber la croissance de <i>Legionella</i>	31
Tableau 7 : Doses infectieuses répertoriées chez le cochon d'inde à travers plusieurs études.....	42
Tableau 8 : DL50 observées chez des cochons d'inde suite à une exposition à <i>Legionella</i>	43
Tableau 9 : Tests utilisés dans le diagnostic de la maladie du légionnaire et leurs caractéristiques.....	54
Tableau 10 : Posologies recommandées par l'Afssaps dans le traitement de la maladie du légionnaire.	56
Tableau 11 : Mesures mises en place pour la gestion du risque lié à <i>Legionella spp</i> ou <i>Legionella pneumophila</i> dans l'eau des installations à risque	60
Tableau 12 : Principaux textes réglementant la présence de <i>Legionella</i> dans les installations à risque.....	61
Tableau 13 : Principales méthodes de traitement des circuits d'eau face aux contaminations à <i>Legionella</i> ; leurs avantages et inconvénients.....	63
Tableau 14 : Nombre de cas de maladie du légionnaire déclarés de 2005 à 2008.	74
Tableau 15 : Espérance de vie à la naissance des hommes et des femmes en 1987 et en 2008.	76
Tableau 16 : Proportion Homme/Femme parmi les patients atteints de la maladie du légionnaire de 1987 à 2008.	77
Tableau 17 : Proportion des patients pour lesquels l'espèce et le séro groupe de <i>Legionella</i> ont pu être identifiés de 1997 à 2006.	82
Tableau 18 : Évolution du nombre de souches d'origine clinique isolées en France depuis 2000 et répartition des isolements de légionelles par espèces et par sérogroupes.....	85
Tableau 19 : Sources des principales épidémies répertoriées de 1998 à 2007.	90

Liste des abréviations

µm	Micromètre
ACES	N-[2-acetamino]-2-amino-ethanesulfonic acid
ADN	Acide désoxyribonucléique
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AODC	Acridin orange direct counts
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American type culture collection
BCYE	Buffered charcoal yeast extract α -cetoglutarate
BEH	Bulletin épidémiologique hebdomadaire
BLS	Bacteriocin-like substances
BPCO	Broncho pneumopathie chronique obstructive
CAP	Competence and adherence associated pili
CCLIN	Centre de coordination de la lutte des infections nosocomiales
CDC	Center of disease control
CFU	Colony forming unit
CHU	Centre hospitalier universitaire
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CLIN	Comité de lutte contre les infections nosocomiales
CNRL	Centre national de référence des légionelles
CSHP	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
Da	Dalton
DDASS	Direction départementale des affaires sanitaires et sociales
DGS	Direction générale de la santé
DI	Dose Infectante
DL50	Dose létale à 50 %
DO	Déclaration obligatoire
dot	defective organelle trafficking
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eml	early stage macrophage-induced locus
enh	enhanced entry
USEPA	United states environmental protection agency
E.P.S.	Exopolymeric substances
EWGLI	European working group for <i>legionella</i> infection
g	gramme
G-C	Guanine-Cytosine
h	heure
H.R.	Humidité relative
Hsp	heat shock protein
icm	intracellular multiplication
IFD	Immunofluorescence directe
IFI	Immunofluorescence indirecte
INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
InVS	Institut national de veille sanitaire
IV	Intraveineuse
L	Litre
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LLAP	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogens

Log	logarithme en base 10
Lp	<i>Legionella pneumophila</i>
LPS	Lipopolysaccharide
m	mètre
MBP	mannose binding lectin
mil	macrophage infectivity loci
min	minute
Mip	Macrophage infectivity potentiator
ml	millilitre
mg	milligramme
ND	Non déterminé
nm	nanomètre
MOMP	Major outer membrane protein
O.A.F.	Open air factor
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Polyéthylène
PEX	Polyéthylène réticulé
pmi	protozoa and macrophage infectivity
PO	Per os
ppm	partie par million
PVC	polychlorure de vinyle
RIA	Radioimmunoassay
RNSP	Réseau national de santé publique
SBT	Sequence-based typing
sg	sérogroupe
sp.	species
TAR	Tour aérorefrigérante
UFC	Unités formant colonies
USA	United states of America
U.V.	Ultraviolet
VBNC	Viable but nonculturable
W	Watt

Introduction

Les légionelles sont des bactéries à Gram négatif appartenant au genre *Legionella*. Elles sont à l'origine de deux types de pathologies regroupées sous le nom de légionellose (Jarraud *et al.*, 2000) : la maladie du légionnaire, pneumopathie sévère, et la fièvre de Pontiac, syndrome pseudo-grippal encore mal connu. Elles présentent la particularité d'avoir un tropisme hydrique et d'être ainsi largement répandues dans la nature ; tant dans les réservoirs naturels (eaux douces, rivières, boues, ...) qu'artificiels (réseaux de distribution d'eau chaude, systèmes de climatisation, tours aérorefrigérantes, eaux thermales, ...) (Fliermans *et al.*, 1981 ; Stout *et al.*, 1985 ; Greub et Raoult, 2004). Des investigations dans ce domaine ont permis de déterminer les conditions favorisant la présence de *Legionella* dans ces réservoirs : les températures variant entre 20 et 45°C (Habicht et Muller, 1988 ; Wadowsky *et al.*, 1985 ; Fliermans *et al.*, 1981), certaines caractéristiques physico-chimiques (Borrella *et al.*, 2005) et la stagnation de l'eau (Ciesielski *et al.*, 1984).

La transmission de la bactérie semble se produire exclusivement par le biais de l'inhalation d'aérosols contaminés (Fields *et al.*, 2002) qui peuvent être produits par bon nombre d'installations issues de l'urbanisation et des progrès techniques apparus ces dernières années (tours aérorefrigérantes, pommeaux de douche, climatiseurs...). De ce fait, dans un souci de prévention, les autorités sanitaires ont établi des valeurs seuils de *Legionella* dans l'eau ainsi qu'un référentiel indiquant les facteurs de risque à la prolifération bactérienne (DGS, 2002). Cela s'ajoute à un ensemble de dispositions prises par les pouvoirs publics français depuis 1997 pour renforcer le système de surveillance de *Legionella*, responsable encore trop souvent aujourd'hui de légionelloses potentiellement mortelles. En effet, malgré l'inscription de cette pathologie aux registres des maladies à déclaration obligatoire depuis 1987, le nombre de légionelloses en France jusqu'en 1997 était très largement sous-estimé.

Ainsi, ce travail a consisté à établir une synthèse de l'ensemble des données épidémiologiques françaises recueillies de 1987 à 2008 afin d'en observer les évolutions et éventuellement d'apporter des éléments tentant de les expliquer. Nous nous sommes attachés à décrire l'évolution du nombre de cas déclarés en France mais également des caractéristiques de chacun des cas déclarés (âge, sexe, létalité) ainsi que celles de l'infection (souches impliquées, expositions à risque).

PARTIE I

Etat de l'art

1. Caractéristiques générales de la bactérie

C'est en juillet 1976, à l'occasion du 58^{ème} congrès de « l'American Legion » à l'hôtel Bellevue-Stratford (Philadelphie, USA) (Figure 1), que 182 des 4400 participants furent atteints d'une pneumopathie aiguë fébrile ; pour 29 d'entre eux, la pathologie s'avéra fatale (Fraser *et al.*, 1977). Une longue enquête épidémiologique permit d'identifier la bactérie responsable et ce n'est qu'en janvier 1977 que la bactérie fut isolée par Mac Dade et Shepard (MacDade *et al.*, 1977). Compte tenu des circonstances, la maladie causée par ce microorganisme fut appelée la « maladie du légionnaire » et la bactérie *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*).



Figure 1 : Hôtel Bellevue-Stratford (Philadelphie, USA)

A l'origine, les premières souches de *Legionella* furent en fait isolées chez le cobaye en 1943 par Tatlock qui avait alors utilisé des procédés destinés à l'isolement de *Rickettsia* (Tatlock, 1944) ; ces isolats n'ont été caractérisés comme étant des légionelles que rétrospectivement. En effet, ces bactéries n'ont fait l'objet d'aucune étude approfondie jusqu'en 1976 (MacDade *et al.*, 1977).

1.1. Classification

Le genre *Legionella* fut établi en 1979 et appartient à la famille des *Legionellaceae*. Si par le passé certains auteurs ont suggéré de séparer cette famille en trois genres (*Legionella*, *Fluoribacter* et *Tatlockia*) (Garrity *et al.*, 1980 ; Fox et Brown, 1993), certaines études ont confirmé, à l'aide de l'analyse de l'ARN 16S, qu'elle n'en contient qu'un, le genre *Legionella* (Fry *et al.*, 1991 ; Benson et Fields, 1998).

A l'heure actuelle, on compte 52 espèces comprenant 70 sérogroupes (sg) distincts (Koide *et al.*, 2008 ; Fields *et al.*, 2002) (Tableau 1). Parmi elles, une vingtaine ont été identifiées comme pathogènes de l'homme (maladie du légionnaire et/ou fièvre de Pontiac) ; les autres n'ont été isolées qu'à partir de prélèvements environnementaux (Fields *et al.*, 2002). Les trois espèces principales sont les suivantes :

- *L. pneumophila* : c'est la bactérie la plus importante en pathologie humaine. On connaît à l'heure actuelle 15 sérogroupes pour cette bactérie. Elle est l'agent responsable d'environ 90% des cas de maladie du légionnaire diagnostiqués en France. Le séroroupe 1 est le plus fréquent (70 à

90% des cas) puis le sérotype 6 (les autres espèces sont généralement isolées chez les personnes immunodéprimées) (Jarraud *et al.*, 2000).

- *L. jordanis* et *L. bozemanii* sont à l'origine de moins de 10% et 3% des cas respectivement.

Pour chacune des espèces répertoriées, un ou plusieurs sérotypes ont été identifiés (Tableau 1).

Tableau 1 : Espèces et sérotypes du genre *Legionella*.
(Fields *et al.*, 2002)

Esèce	Nombre de SGs	Nombre de SGs associés à une pathologie
1. <i>L. pneumophila</i>	15	15
2. <i>L. bozemanii</i>	2	2
3. <i>L. dumoffii</i>	1	1
4. <i>L. micdadei</i>	1	1
5. <i>L. longbeachae</i>	2	2
6. <i>L. jordanis</i>	1	1
7. <i>L. wadsworthii</i>	1	1
8. <i>L. hackeliae</i>	2	2
9. <i>L. feeleii</i>	2	2
10. <i>L. maceachernii</i>	1	1
11. <i>L. birminghamensis</i>	1	1
12. <i>L. cinцинnatiensis</i>	1	1
13. <i>L. gormanii</i>	1	1
14. <i>L. sainthelensis</i>	2	2
15. <i>L. tucsonensis</i>	1	1
16. <i>L. anisa</i>	1	1
17. <i>L. lansingensis</i>	1	1
18. <i>L. erythra</i>	2	1 ^b
19. <i>L. parisiensis</i>	1	1
20. <i>L. oakridgensis</i>	1	1
21. <i>L. spritensis</i>	1	0 ^a
22. <i>L. jamestowniensis</i>	1	0 ^a
23. <i>L. santicroicis</i>	1	0 ^a
24. <i>L. cherrii</i>	1	0 ^a
25. <i>L. steigerwaltii</i>	1	0 ^a
26. <i>L. rubrilucens</i>	1	0 ^a
27. <i>L. israelensis</i>	1	0 ^a
28. <i>L. quinlivanii</i>	2	0 ^a
29. <i>L. brunensis</i>	1	0 ^a
30. <i>L. moravica</i>	1	0 ^a
31. <i>L. gratiana</i>	1	0 ^a
32. <i>L. adelaidensis</i>	1	0 ^a
33. <i>L. fairfieldensis</i>	1	0 ^a
34. <i>L. shakespearei</i>	1	0 ^a
35. <i>L. waltersii</i>	1	0 ^a
36. <i>L. genomospecies</i>	1	0 ^a
37. <i>L. quateirensis</i>	1	0 ^a
38. <i>L. worsteiensis</i>	1	0 ^a
39. <i>L. geestiana</i>	1	0 ^a
40. <i>L. natarum</i>	1	0 ^a
41. <i>L. londoniensis</i>	1	0 ^a
42. <i>L. taurinensis</i>	1	0 ^a
43. <i>L. lytica</i>	1	0 ^a
44. <i>L. drozanski</i>	1	0 ^a
45. <i>L. rowbothamii</i>	1	0 ^a
46. <i>L. fallonii</i>	1	0 ^a
47. <i>L. brasiliensis</i>	1	0 ^a
48. <i>L. beliardensis</i>	1	0 ^a

^a Espèces présentées dans l'ordre chronologique de leur date d'isolement ou d'identification ; ^b *L. erythra* SG 2 a été isolé chez l'homme ; ^c espèces isolées uniquement de l'environnement.

De plus, il existe des bactéries nommées *Legionella-like amoebal pathogens* (LLAP) caractérisées par (i) leur incapacité à cultiver sur des milieux de culture spécifiques des légionelles. et (ii) leur capacité à infecter et à se multiplier intra cellulièrement au sein des amibes par des mécanismes similaires à ceux impliqués dans l'infection de macrophages humains (Rowbotham, 1983 ; Rowbotham, 1980 ; Chandler *et al.*, 1977).

L'étude du degré de similarité entre l'ARN 16S des LLAP et des espèces du genre *Legionella* montre que les LLAP forment un cluster cohérent avec les autres membres de la famille des *Legionellaceae* (Adeleke *et al.*, 1996) (Figure 2). Il en existe 12 espèces qui sont regroupées en 5 espèces de *Legionella* (Adeleke *et al.*, 1996 ; Adeleke *et al.*, 2001 ; Birtles *et al.*, 1996 ; La Scola *et al.*, 2004) (Figure 2) :

- LLAP-2, LLAP-3, *L. rowbothamii* (LLAP-6), *L. lytica* (de type LLAP-7 ou LLAP-9),
- *L. drozanskii* (LLAP-1),
- LLAP-8,
- *L. fallonii* (LLAP-10),
- LLAP-4, LLAP-11 et *L. drancourtii* (LLAP-12).

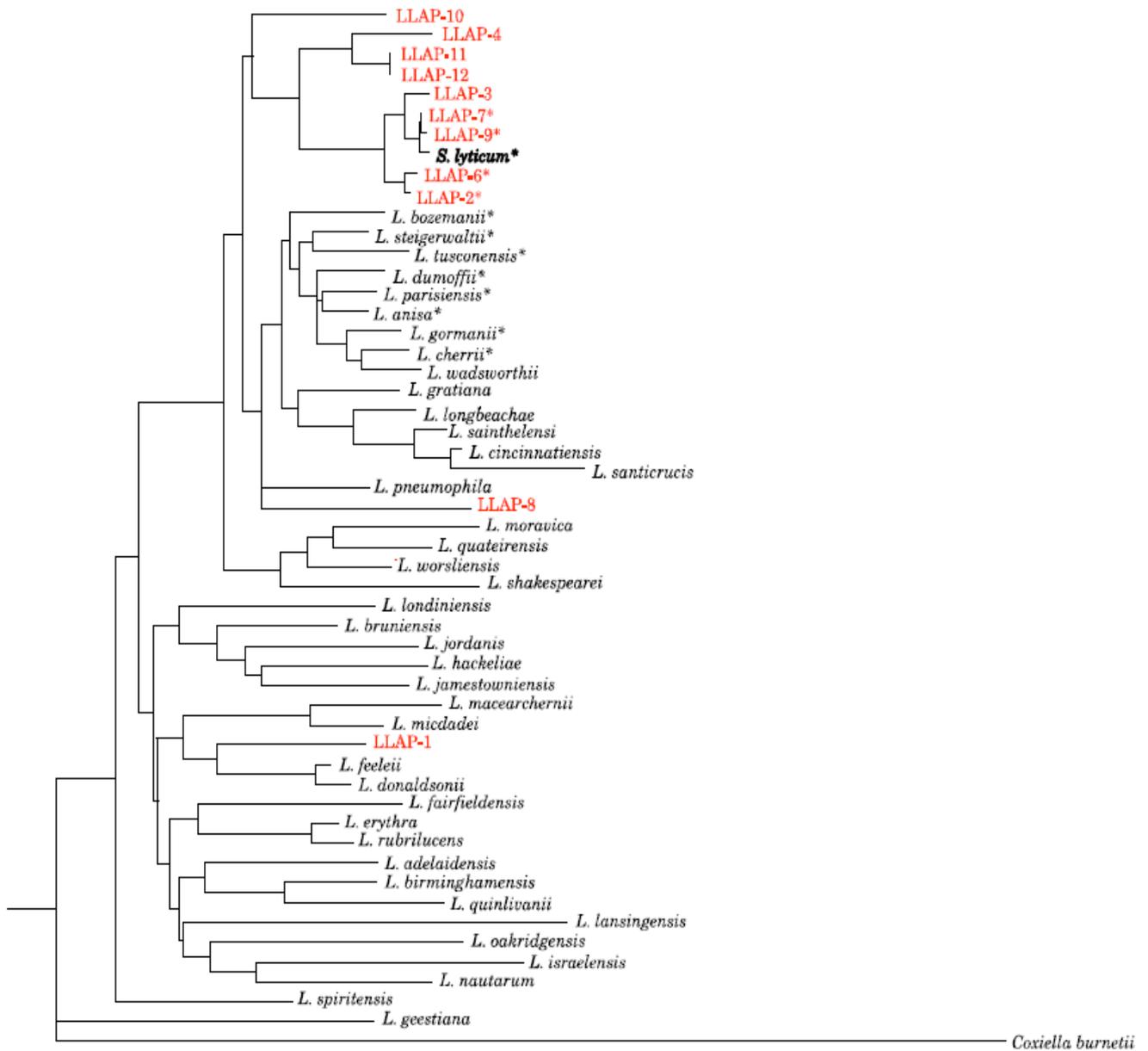


Figure 2 : Résultats de l'analyse phylogénétique basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S de chaque espèce de *Legionella* et des LLAP.
(Adeleke *et al.*, 1996)

1.2. Morphologie

Legionella spp. est un bacille à Gram négatif, aérobie, non sporulé, non acido-résistant et non capsulé. Sa taille varie entre 0,3 à 0,9 µm de large et 2 à 20 µm (ou plus) de long (Winn, 1988). Ces variations de taille sont en partie dues, pour les légionelles comme pour la plupart des bactéries, à la modification des conditions environnementales (Morita *et al.*, 1997). De plus, chez les légionelles, la taille de la bactérie est significativement réduite, avec des longueurs de moins 1µm, après leur passage intra-amibien (Byrne et Swanson, 1998) (§ I.4.2.3).

A l'exception de trois espèces (*L. oakridgensis*, *L. nautarum* et *L. londiniensis*), les légionelles sont mobiles grâce à la présence d'un flagelle en position polaire (Heuner *et al.*, 1995). Cependant, là encore, la flagellation des légionelles est variable : la présence ou non du flagelle dépendrait de la température du milieu puisqu'il est absent au-delà de 37°C (Ott *et al.*, 1991). De plus, le flagelle est absent lorsque la bactérie se trouve à l'intérieur des macrophages ou protozoaires (Rodgers *et al.*, 1980 ; Byrne et Swanson, 1998). Ce flagelle peut atteindre 8 µm de long et 14 à 25 µm de diamètre (Winn, 1988 ; Rodgers, 1980) et est attaché à la paroi cellulaire par un corps basal formant un crochet comme c'est le cas pour les autres bactéries à Gram négatif. La microscopie électronique a également permis de déceler la présence de pili répartis à la surface de la bactérie (Rodgers *et al.*, 1980). Un pili nommé pili de type IV serait à l'origine du déplacement des légionelles grâce à une extension de ce pili suivie d'un attachement au support et enfin d'une rétractation, permettant ainsi l'avancée de la bactérie par « twitching » (Figure 3) (Coil et Anné, 2009). Stewart et ses collègues (2009) observent une autre forme de déplacement par « glissement » qui ne serait dû ni aux pili ni aux flagelles mais à la présence d'un système de sécrétion appelé système de sécrétion de type II en présence d'un surfactant de composition inconnue.



Figure 3 : Zone de mobilité par « twitching » observée chez *L. pneumophila* après 96 h de culture à 37°C sur gélose BYE- α . (Coil et Anné, 2009)

1.3. Caractéristiques biochimiques et enzymatiques

Les *Legionella* sont toutes uréase-négatives et non fermentatives. Elles sont toutes catalase-positives à l'exception de *L. worsleiensis* et la plupart des espèces produisent une β -lactamase. L'oxydase est le plus souvent négative sauf pour *L. anisa*. De plus, certaines espèces, dont *L. pneumophila*, se distinguent par leur capacité à hydrolyser l'hippurate ; ce test peut donc être utilisé comme critère présomptif pour distinguer quelques espèces de *Legionella* des autres.

La paroi des *Legionella* présente quelques spécificités au niveau de sa composition en acides gras, du peptidoglycane et des ubiquinones (coenzyme Q, enzymes spécifiques de l'activité respiratoire). Ces bactéries synthétisent plus d'acides gras ramifiés que d'acides gras non ramifiés. Elles présentent de 40 à 90 % d'acides gras insaturés dans la paroi (Lambert et Moss, 1989 ; Marmet *et al.*, 1988), ce qui est assez inhabituel pour une bactérie à Gram négatif. De plus, *Legionella* se caractérise par la présence des acides gras ramifiés i-14:0, 12-méthyl tétradécanoïque (a-15:0), 14-méthyl pentadécanoïque (i-16:0), hexadécanoïque (i-16:1), et méthyl hexadécanoïque (a-17:0). Cela peut s'avérer être une méthode rapide et précise pour identifier *Legionella* dans un prélèvement

suspect (Lambert et Moss, 1989). L'absence ou la présence en très faible quantité (< 0,5 % à 5 % selon les espèces de *Legionella*) d'hydroxyacides est également remarquable (Lambert et Moss, 1989 ; Finnerty *et al.*, 1979).

Son peptidoglycane est majoritairement constitué d'acide muramique, de glucosamine, d'acide glutamique, d'alanine et d'acide *meso*-diaminopimélique. Il serait doué d'une plus grande résistance physique du fait de la liaison de 80 à 90 % des résidus de l'acide diaminopimélique (Amano et Williams, 1983).

Enfin, *Legionella* possède des ubiquinones particulières puisqu'elles sont composées de longues chaînes latérales de 10 à 14 unités (habituellement constituées de 7 à 10 unités) en mélange complexe (Lambert et Moss, 1989 ; Marmet *et al.*, 1988). Elles ont un rôle majeur dans le transport des électrons et la phosphorylation oxydative. De plus, couplée à la caractérisation des acides gras, l'étude des ubiquinones permet d'identifier la plupart des légionelles (Lambert et Moss, 1989).

Enfin, les données relatives au génome de *Legionella* concernent avant tout *L. pneumophila* (la plus étudiée car la plus souvent en cause en pathologie humaine). Ces dernières années, le génome de quatre souches de *L. pneumophila* a été séquencé : *L. pneumophila* souches Paris et Lens (Cazalet *et al.*, 2004), *L. pneumophila* souche Philadelphia (Chien *et al.*, 2004) et *L. pneumophila* souche Corby (Steinert *et al.*, 2007). Les quatre souches ont un unique chromosome circulaire et les souches Paris et Lens possèdent en plus un plasmide. Le génome de *L. pneumophila* est d'une taille très importante par rapport à d'autres pathogènes intracellulaires tels que *Rickettsia*, *Bartonella* ou *Chlamydia* sp. (Lens et Philadelphia : 3,3 Mb et Paris et Corby : 3,5 Mb) (Fuxelius *et al.*, 2007 ; Saenz *et al.*, 2007 ; Thomson *et al.*, 2008). Cela résulte du grand nombre de gènes présents chez *Legionella* et reflète probablement les capacités de cette bactérie à s'adapter aux conditions environnementales et aux hôtes qu'elle infecte (Gomez-Valero *et al.*, 2009).

Les quatre souches de *L. pneumophila* présentent une haute similarité dans leur composition en base G-C (GC %) : 38 % des régions codantes. De plus, hormis l'inversion d'un ensemble de gènes chez *L. pneumophila* souche Lens par rapport aux trois autres souches, l'ordre des gènes est hautement conservé parmi ces quatre génomes (Gomez-Valero *et al.*, 2009).

Enfin, il a également été relevé une quantité importante de protéines très similaires à celles des eucaryotes. Cette caractéristique est probablement due à la co-évolution de cette bactérie avec les protozoaires qu'elle infecte (Albert-Weissenberg *et al.*, 2007).

1.4. Caractéristiques culturelles

Au regard des conditions nécessaires à la culture de la bactérie en laboratoire, nous comprenons mieux les raisons de son identification tardive en 1977. En effet, *Legionella* est

incapable de se développer sur des milieux de culture bactériologiques classiques mais a au contraire besoin de conditions de culture très particulières.

Dans les conditions de laboratoire, *Legionella* est une bactérie dont la croissance est optimale pour un pH proche de la neutralité : pH=6,9 (Weaver et Feeley, 1979 ; Burges, 1995) et, pour la majorité des espèces, pour une température de 36°C +/- 1°C. Ces bactéries sont chimio-organotrophes, c'est-à-dire que leur énergie provient de l'oxydation de molécules organiques (Benson et Fields, 1998). Ainsi, elles utilisent des acides aminés (arginine, acide L-glutamique) comme source d'énergie et de carbone et leur croissance est favorisée en atmosphère enrichie en CO₂ (2,5 %). De plus, leur développement sur milieux de culture nécessite qu'ils soient enrichis en fer et L-cystéine car elles sont déficientes en cet acide aminé (Fields *et al.*, 2002 ; Bornstein et Fleurette, 1992).

En laboratoire, la culture est classiquement réalisée sur gélose BCYE- α (Buffered Charcoal Yeast Extract α -cétoglutarate) contenant du charbon (détoxifiant, absorbant les acides gras inhibiteurs), un tampon ACES (tampon acide), de la L-cystéine et du fer (sous forme de phosphate ferrique) (Feeley *et al.*, 1979). Après 3 à 7 jours de culture sur milieu gélosé apparaissent des colonies grisâtres, de consistance muqueuse (Figure 4). Enfin, *Legionella* se caractérise par son polymorphisme et son aspect dit « en verre-brisé » à la loupe binoculaire.



Figure 4 : Culture de *L. pneumophila* sur gélose BCYE- α .
(www.rapidmicrobiology.com)

1.5. L'état viable non cultivable (VBNC)

Les bactéries VBNC sont incapables de cultiver sur des milieux de culture conventionnels dans un temps donné, mais gardent néanmoins une activité métabolique (Yamamoto, 2000). Par définition, ces bactéries doivent être capables de recouvrer leur aptitude à cultiver si des conditions favorables (de température, nutriments, ...) sont réunies. Cette phase de « ressuscitation » (MacDougald *et al.*, 1998) peut constituer une démonstration de l'existence du caractère VBNC chez l'espèce bactérienne considérée. Colwell (2000) a ainsi émis l'hypothèse que cet état correspondait à une stratégie de survie vis-à-vis des conditions défavorables de l'environnement.

Ce mécanisme s'accompagnerait de transformations cellulaires comme la réduction de la taille des cellules, la diminution de la quantité d'ARN, la condensation du cytoplasme, l'incapacité à se multiplier voire une réduction de l'activité métabolique (Byrd, 2000 ; MacDougald *et al.*, 1998 ; Tangwatcharin *et al.*, 2006).

Plusieurs études (Tableau 2) ont pu montrer que *L. pneumophila* était capable d'entrer en

état VBNC et d'être revivifiée (c'est-à-dire retrouver son caractère cultivable) par différents procédés dont la coculture avec des protozoaires (*Tetrahymena pyriformis* GL, *A. castellanii*, *A. polyphaga*) (Yamamoto *et al.*, 1996 ; Hussong *et al.*, 1987 ; Steinert *et al.*, 1997 ; Ohno *et al.*, 2003 ; Alleron *et al.*, 2008 ; Garcia *et al.* ; 2007). Les facteurs répertoriés comme induisant la formation de VBNC chez *Legionella* sont nombreux : les températures élevées, les pH extrêmes (Ohno *et al.*, 2003), la faible quantité de nutriments (Paszko-Kolva *et al.*, 1992 ; Yamamoto *et al.*, 1996) ou encore les traitements oxydants (Bej *et al.*, 1991 ; Garcia *et al.*, 2007 ; Huq *et al.*, 2003) (Tableau 2). Cependant, toute la difficulté est de démontrer de manière concluante que les cellules cultivables après ressuscitation sont le résultat d'un véritable recouvrement de cellules VBNC, par opposition à la re-croissance de quelques cellules cultivables qui n'auraient pas totalement été détectées dans la population VBNC.

Tableau 2 : Exemples de conditions induisant l'état VBNC chez *Legionella*.

Facteurs de stress induisant l'état VBNC	Définition de l'état VBNC	Méthode de détection de viabilité	Méthode de recouvrement	Références
Eau du robinet, 4°C et 37°C			- Jaune d'œuf embryonné de poule - <i>Tetrahymena pyriformis</i> GL - <i>Acanthaloeba castellanii</i>	Hussong <i>et al.</i> , 1987
Eau ultra pure (37°C, 35 j)		Activité estérasique	<i>Tetrahymena pyriformis</i> GL	Yamamoto <i>et al.</i> , 1996
Eau du robinet stérilisée (20°C, 125 j)	Absence de croissance bactérienne après filtration (0,2 µm) de l'échantillon et dépôt du filtre sur gélose.	AODC (Acridin Orange Direct Counts)	<i>Acanthaloeba castellanii</i>	Steinert <i>et al.</i> , 1997
Eau chaude riche en minéraux (pH 5, 15 j)	Perte complète de cultivabilité confirmée par la formation d'aucune colonie lors d'un dépôt de 1 ml d'échantillon sur 10 boîtes de gélose BCYE.	Intégrité membranaire (Marquage BacLight)	<i>Acanthaloeba castellanii</i>	Ohno <i>et al.</i> , 2003
Eau du robinet (42°C, 65 j)				
Traitement au chlore		Activité respiratoire		Bej <i>et al.</i> , 1991
Traitement à la monochloramine	Absence de colonie après traitement à la monochloramine (1 mg/L)	Intégrité membranaire (Marquage BacLight) et activité estérasique	<i>A. castellanii</i>	Alleron <i>et al.</i> , 2008
Traitement au NaOCl	Etude préliminaire montrant une absence totale de cultivabilité de <i>Legionella</i> après un traitement au chlore de 256 ppm.		<i>A. polyphaga</i>	Garcia <i>et al.</i> , 2007

1.6. Facteurs de virulence

Du fait de la très grande prévalence de *L. pneumophila* (en particulier du sérotype 1) chez les patients atteints de maladie du légionnaire, l'étude des facteurs de virulence des légionelles concerne surtout cette espèce. La virulence des légionelles s'exprime au travers de plusieurs mécanismes régulés génétiquement et détaillés dans les paragraphes suivants.

1.6.1. Le système dot/icm

Les légionelles ont la particularité d'être des parasites intracellulaires de cellules eucaryotes pourtant éloignées d'un point de vue de l'évolution (les macrophages chez l'homme et les protozoaires dans l'environnement) selon un mécanisme très similaire. Elles sont en effet capables d'entrer dans la cellule hôte sans être détruites afin de s'y multiplier. Ceci est rendu possible par l'existence de gènes *dot* (*defective organelle trafficking*) et/ou *icm* (*intracellular multiplication*). Ces groupes de gènes, situés sur deux régions distinctes du chromosome bactérien, ont été identifiés indépendamment par deux équipes (Mara *et al.*, 1992 ; Berger *et al.*, 1993). Ils codent pour un appareil de sécrétion de type IV qui constitue, d'après Lammertyn et Anné (2004), le système de sécrétion le plus important parmi ceux impliqués dans la virulence chez *L. pneumophila*. Il permet en effet la synthèse et la translocation de molécules effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte, modulant ainsi les propriétés du phagosome (Segal *et al.*, 1999b ; Christie *et al.*, 2000 ; Christie, 2001). Le but est de permettre la formation d'une niche répliquative qui rend possible la multiplication des légionelles dans les macrophages et les protozoaires (Sadosky *et al.*, 1993 ; Segal *et al.*, 1999a ; Segal *et al.*, 2002).

Enfin, des auteurs ont montré que le locus *dot/icm* pouvait être transféré horizontalement d'une souche virulente de *L. pneumophila* vers une souche avirulente via un transfert conjugatif d'ADN chromosomique (Miyamoto *et al.*, 2003). Ce mécanisme permet l'acquisition du caractère virulent chez une souche qui ne le possède pas sachant que cette conjugaison peut avoir lieu entre deux souches de sérogroupes différents.

1.6.2. Les protéines MOMP

Comme de nombreux agents pathogènes, les légionelles présentent à leur surface des appendices (protéines, pili, lipopolysaccharides, ...) qui participent ou sont supposé participer à la virulence de la bactérie (Jarraud et Freney, 2006).

Les protéines MOMP (Hindahl et Iglewski, 1984) sont des protéines majeures de la

membrane externe (Engleberg *et al.*, 1986 ; Gabay et Horwitz, 1985). Il y en a actuellement trois décrites dans la littérature : la protéine ompS, hautement conservée parmi les sérogroupes de *Legionella pneumophila*, est codée par le gène *ompS* et présente un poids moléculaire de 28 kDa (Hoffman *et al.*, 1992) ; la protéine ompM de 25 kDa est codée par le gène *ompM* (High *et al.*, 1993) et une lipoprotéine de 19 kDa n'a pas de fonction connue (Cianciotto, 2001). Les protéines MOMP sont des porines et seraient nécessaires pour infecter l'hôte (Gabay *et al.*, 1985 ; Cianciotto *et al.*, 1989) : en se liant aux récepteurs du complément CR1 et CR3 situés à la surface des monocytes humains, elles favoriseraient l'attachement de la bactérie à la cellule hôte (Steinert *et al.*, 2002).

1.6.3. La protéine Mip

La protéine Mip (*macrophage infectivity potentiator*) codée par le gène *mip* est une protéine de 24 kDa exprimée à la surface des *L. pneumophila*. L'étude d'un mutant dépourvu de gène *mip* fonctionnel a montré son importance dans l'invasion des macrophages et protozoaires par *L. pneumophila* puisque celle-ci s'est avérée moins efficace que chez la souche bactérienne sauvage. Cependant, la multiplication intracellulaire ne semblait pas affectée (Wieland *et al.*, 2002). A ce jour, les mécanismes qui l'impliquent dans la virulence sont encore méconnus. Cependant, il a été démontré que la partie N-terminale, la dimérisation de la protéine Mip et son activité peptidylpropyl cis/trans isomérase sont nécessaires à l'infection des cellules pulmonaires du cobaye. A l'inverse, son activité enzymatique «peptidylpropyl cis/trans isomérase » n'est pas indispensable à l'invasion de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* alors que la partie N-terminale et la dimérisation le sont (Kholer *et al.*, 2003).

1.6.4. La protéine chaperonne Hsp60

Les bactéries produisent des protéines chaperonnes dont la fonction est d'assister d'autres protéines dans leur maturation, en leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat. Parmi les protéines chaperonnes on trouve les protéines dites de stress Hsp60 (*heat shock protein*). Lema et Brown (1995) ont mis en évidence chez *Legionella pneumophila* souche Philadelphia, une protéine de 60 kDa nommée Hsp60 et codée par le gène *htpB*. La revue de Jarraud et Freney (2006) précise que cette protéine est localisée en surface ou dans le périplasme et non pas uniquement dans le cytoplasme comme chez *E. coli* (Garduno *et al.*, 1998). Cette protéine semble favoriser l'adhésion aux cellules hôtes, protozoaires ou humaines, et l'invasion des cellules HeLa (Garduno *et al.*, 1998),

mais ses récepteurs cellulaires ne sont pas encore identifiés.

1.6.5. Les pili

La présence de pili à la surface des légionelles a été mise en évidence par microscopie électronique (Rodgers *et al.*, 1980). Deux types de pili sont présents : ceux de petite taille (0,1 à 0,6 µm) et ceux de taille plus importante (0,8 à 1,5 µm) qui ne semblent pas être présents en même temps sur une même bactérie, mais elle peut exprimer à des instants différents l'un ou l'autre type de pili (Stone et Abu Kwaik, 1998). L'expression de ces organelles de surface est régulée par divers gènes codant pour les protéines de ces pili tels que *pilB*, *pilC*, *pilD* ou *pilE* (Jarraud et Freney, 2006). Les pili longs ont été rapprochés des pili de type IV, désignés pili CAP (*competence and adherence associated pili*) car intervenant dans l'adhésion des légionelles aux cellules hôtes (Swanson et Hammer, 2000). L'étude d'un mutant dont l'expression du pili de type IV était diminuée a montré une adhérence aux cellules HeLa, aux macrophages (U937) et aux amibes *Acanthamoeba polyphaga* diminuée de 50 %. Les pili n'interviendraient pas dans les mécanismes de multiplication intracellulaire des légionelles.

1.6.6. Les flagelles

Les légionelles sont motiles par la présence d'un ou plusieurs flagelles pouvant atteindre 8 µm de long et d'environ 14 à 25 nm de diamètre (Rodgers *et al.*, 1980 ; Chandler *et al.*, 1980). Le flagelle est composé d'une protéine majeure, FlaA, régulée par le gène *flaA* (Dietrich *et al.*, 2001). La flagellation des légionelles est dépendante des conditions de croissance (température milieu,...) (Bosshardt *et al.*, 1997) et des phases du cycle de multiplication intracellulaire, puisqu'elle s'exprime au cours de la phase dite infectieuse (transmissive) lors de son relargage dans l'environnement. Les travaux de Dietrich *et al.* (2001) montrent que l'infection de cellules hôtes (Cellules HL-60 et amibe *A. castellanii*) par un mutant *flaA* de *Legionella pneumophila* souche Corby est réduite, démontrant ainsi l'importance du flagelle durant les premières étapes de l'infection et de la liaison avec les cellules hôtes.

1.6.7. Les lipopolysaccharides (LPS)

Classiquement, chez les bactéries à gram négatif, les LPS sont composés de 3 parties, de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule : le lipide A ancré dans la membrane externe, le core et la

chaîne O spécifique. Dans le cas des légionelles, le LPS constitue des antigènes spécifiques des différents sérogroupes utilisés pour la classification des souches de légionelles (Joly *et al.*, 1986). Il présente des spécificités au niveau du lipide A et de la chaîne O. Selon Zähringer *et al.* (1995), le lipide A du LPS se distingue de celui des autres bactéries à gram négatif par la présence de grandes quantités d'acides gras ramifiés (40 à 90%). La chaîne O spécifique est un homopolymère d'un dérivé 5-N-acétimidoylé et 7-N-acétylé de l'acide légionaminique (acide 5,7-diamino-3,5,7,9-tétradésoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonique). Les N-méthylations et le degré de O-acétylation de cette chaîne définissent les sérogroupes et influencent l'hydrophobicité. Ceci laisse à penser que ses interfaces hydrophobes (Knirel *et al.*, 1994) jouent, ou sont suspecté jouer un rôle fondamental dans l'adhésion - agrégation des légionelles à des surfaces, des biofilms ou des cellules hôtes (Luneberg *et al.*, 1998).

1.6.8. Systèmes de sécrétion

Les *Legionella* sont dotées d'un système de sécrétion de type II permettant le transport de phosphatases, d'une RNase, d'une zinc metalloprotéase, de mono- et tri-acylglycerol lipases, de la phospholipase A, de la lypophospholipase A et de la p-nitrophenyl phosphorylcholine hydrolase. Ce système dépend de l'expression d'un ensemble de gènes inclus dans les loci *pilBCD* et *lspFGHIJK* (Rossier *et al.*, 2001). La mutation de *pilD* empêche la légionelle d'infecter les cellules hôtes quelles qu'elles soient tandis que la mutation de *lspGH* n'empêche que sa multiplication dans les amibes (Hales *et al.*, 1999 ; Aragon *et al.*, 2000). Les facteurs sécrétés comprennent aussi la légiolyse qui a pour rôle l'hémolyse, la pigmentation marron et la résistance accrue à la lumière chez *L. pneumophila* mais sans intervenir dans la croissance intracellulaire (Steinert *et al.*, 2001).

1.6.9. Autres facteurs de virulence

De nombreux autres facteurs sont connus pour intervenir dans la virulence chez *Legionella* sans qu'on en connaisse véritablement le rôle. On peut citer les gènes *pmi* (*protozoa and macrophage infectivity*), *mil* (*macrophage infectivity loci*), *eml* (*early stage macrophage-induced locus*) et *enh* (*enhanced entry*) qui participent à l'entrée de la bactérie dans la cellule et à la modification de la voie endosomale (Abu Kwaik *et al.*, 1996 ; Gao *et al.*, 1997 ; Harb *et al.*, 2000). Seul le gène *rtxa* est caractérisé comme étant impliqué dans plusieurs mécanismes bactériens associés à la virulence à savoir : l'adhérence, la cytotoxicité, la formation de pores et l'entrée de *L. pneumophila* dans la cellule hôte (Cirillo *et al.*, 2001).

Pour finir, le gène *ptsP* serait lui impliqué plus en amont puisqu'il interviendrait dans la transduction du signal pour l'expression de facteurs de virulence. Sa mutation entraîne une baisse de la multiplication des légionelles dans les macrophages et une absence complète de réplication dans les cellules épithéliales (Higa *et al.*, 2001).

2. Écologie des légionelles

Legionella est une bactérie dont le réservoir naturel est majoritairement constitué de l'environnement hydrique. Aucun cas d'homme ou d'animal porteur sain n'a jamais été recensé.

2.1. Les réservoirs de *Legionella*

Legionella étant un agent d'origine hydro-tellurique, elle est capable de coloniser des biotopes aquatiques, tant naturels qu'artificiels, du fait de la présence de facteurs favorables à son développement.

2.1.1. Réservoirs naturels

2.1.1.1. Les milieux hydriques

Legionella est ubiquitaire dans les environnements aquatiques, ceux-ci constituant son principal réservoir (Fliermans *et al.*, 1981 ; Ciesielski *et al.*, 1984 ; Winn, 1988 ; Steinert *et al.*, 2002 ; Fields *et al.*, 2002). Ortiz et Hazen (1987) ont étudié la présence de *Legionella* sur différents sites de Porto Rico (16 sites marins, 8 d'eau douce et 2 échantillons provenant d'un estuaire). Sur l'ensemble des sites, l'espèce *pneumophila* était la plus abondante. Cependant, d'autres espèces étaient largement répandues sur tous les sites : *L. bozemanii* , *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae* et *L. micdadei*. De même, Palmer *et al.* (1993) ont retrouvé des légionelles dans l'eau de mer ; néanmoins, *Legionella* y est moins résistante que dans l'eau douce du fait de l'action délétère de la salinité et des rayonnements solaires sur sa survie (Dutka *et al.*, 1984). La bactérie est ainsi retrouvée dans les lacs (Fliermans *et al.*, 1981 ; Tison *et al.*, 1983), au niveau de rivières et de leurs rives (Fliermans *et al.*, 1981), dans des eaux de pluie (Albrechtsen, 2002) ou encore dans des nappes phréatiques (Lieberman *et al.*, 1994 ; Bhopal, 1995 ; Riffard *et al.*, 2001 ; Brooks *et al.*, 2004 ; Costa *et al.*, 2005).

2.1.1.2. Les sols et composts

Très peu de travaux font état de l'isolement de *Legionella* dans des sols (Morris *et al.*, 1979). Elle a cependant été isolée de sable ou encore d'un sol humide bordant un ruisseau (USEPA, 1985). Steele et ses collaborateurs (1990) ont montré la multiplication de *L. longbeachae* dans un sol. En étudiant une épidémie de maladie du légionnaire survenue dans le sud de l'Australie entre 1988 et 1989, ces mêmes auteurs ont découvert la présence de la bactérie dans du compost, la bactérie étant capable d'y survivre pendant 7 mois à température ambiante. D'autres auteurs ont également constaté l'existence de *Legionella* dans ce type de milieu (Koide *et al.*, 2001 ; CDC, 2000 ; Koide *et al.*, 1999 ; Hughes et Stelle, 1994 ; Stelle *et al.*, 1990a et b). Ainsi, la présence et la survie prolongée de *Legionella* dans les composts suggèrent que ce sol, probablement du fait de la présence d'eau, pourrait être un habitat naturel de la bactérie et constituer une source d'exposition pour l'homme. *L. longbeachae* a d'ailleurs été associée à plusieurs cas d'infection lors de l'utilisation de ce compost (CDC, 2000 ; Koide *et al.*, 1999 ; Steele *et al.*, 1990a).

2.1.2. Réservoirs artificiels : les systèmes hydriques

Legionella, du fait de son ubiquité dans les milieux hydriques naturels, peut coloniser des environnements hydriques artificiels lorsque les conditions sont favorables : des températures d'eau comprises entre 35°C et 45°C, une éventuelle stagnation de l'eau, la présence de certains minéraux (fer, silicone), les dépôts de tartre, la présence d'autres micro-organismes... (Kramer et Ford, 1994 ; Lin *et al.*, 1998 ; Steinert *et al.*, 2002). Ainsi, de nombreux réservoirs artificiels aquatiques pourraient permettre l'amplification et la dissémination de *Legionella* présentes dans l'eau potable (USEPA, 1985). Parmi ceux-ci, on retrouve les réseaux de distribution d'eau, les tours aéroréfrigérantes, les équipements de thérapie respiratoire, les systèmes de climatisation, bains à remous...

2.1.2.1. Les systèmes de distribution d'eau potable

Legionella est présente au niveau de points d'usage tels que des robinets, pommes de douche mais aussi dans des ballons d'eau chaude... Beaucoup d'études ont ainsi révélé la présence de la bactérie dans les systèmes de distribution d'eau potable aussi bien dans des hôpitaux, des établissements communautaires (hôtel, immeuble), que dans des réseaux municipaux. Nous en avons répertoriées quelques unes pour exemple (Tableau 3).

Tableau 3 : Présence de *Legionella* dans les réservoirs et systèmes de distribution d'eau potable.

Cadre	Concentrations retrouvées	Références
Hôpital	~ 2, 5.10 ³ UFC/mL	Leoni <i>et al.</i> , 2005
		Perola <i>et al.</i> , 2005
		Alary et Joly, 1992
		Goetz <i>et al.</i> , 1998
		Pan <i>et al.</i> , 1996
Hôtel	Concentration moyenne de 1, 9.10 ³ UFC/L et 19, 4 % des échantillons sont ≥ 10 ⁴ UFC/ml	Borella <i>et al.</i> , 2005
	Qualitatif : présence de colonies ou pas (7 échantillons positifs sur 20)	Alexiou <i>et al.</i> , 1989
		Hossain et Hoque, 1994
Réseaux municipaux		Stout <i>et al.</i> , 1992
		Lee <i>et al.</i> , 1988
		Witherell <i>et al.</i> , 1988
	~ 10 ³ UFC/mL	States <i>et al.</i> , 1987
		Benson <i>et al.</i> , 1996
		Broadhead <i>et al.</i> , 1988

La colonisation des réseaux d'eau semble en partie déterminée par la température. Des études réalisées en milieu hospitalier ont montré que la présence des bactéries était plus fréquente lorsque la température de l'eau circulant dans les tuyaux était inférieure à 50°C ou 60°C (Plouffe *et al.*, 1983 ; Vickers *et al.*, 1987). De même, une étude réalisée sur 55 résidences aux Etats-Unis a montré que les réseaux d'eau contaminés par *Legionella* présentaient en moyenne une température de 40,5°C (Lee *et al.*, 1988). S'ajoutent à cela le mauvais entretien et l'ancienneté des ballons de stockage d'eau chaude des installations (Alary et Joly, 1992 ; Vickers *et al.*, 1987).

Enfin, les matériaux utilisés dans les réseaux de distribution jouent également un rôle. Le cuivre semble limiter plus ou moins durablement la colonisation à l'inverse des matériaux plastiques (PVC, PE, PEX) qui semblent la favoriser (Van des Kooij *et al.*, 2005 ; Rogers *et al.*, 1994 ; Bezanson *et al.*, 1992).

2.1.2.2. Tours aéroréfrigérantes

Les tours aéroréfrigérantes (TAR) sont des systèmes de refroidissement d'eau. Il en existe deux types : par voie humide et par voie sèche. Ces dernières ne présentent aucun risque de dissémination de *Legionella* puisqu'elles ne permettent pas de pulvérisation d'eau dans l'air. Au contraire, les TAR par voie humide présentent un réel risque de dissémination du fait de leur mode de fonctionnement. Elles constituent des échangeurs de chaleur « air/eau » dans lesquels l'eau à refroidir est en contact direct avec l'air ambiant. A l'intérieur d'une TAR, l'eau à refroidir est pulvérisée en fines gouttelettes en partie haute de la tour. Elle s'écoule ensuite sur une surface d'échange thermique qui, de par sa structure, augmente les surfaces de contact entre l'air et l'eau et donc l'échange thermique. L'eau refroidie est collectée dans un bassin de rétention en bas de la tour avant de retourner vers l'échangeur ou le procédé à refroidir. Dans ce système, l'air est mis en mouvement par un ventilateur (tirage for ) ou par un courant d'air (tirage naturel). Ce flux d'air se charge en humidité et entraîne les gouttelettes d'eau. Pour limiter le plus possible ce phénomène, un séparateur de gouttelettes est placé en haut de la tour (Figure 5).

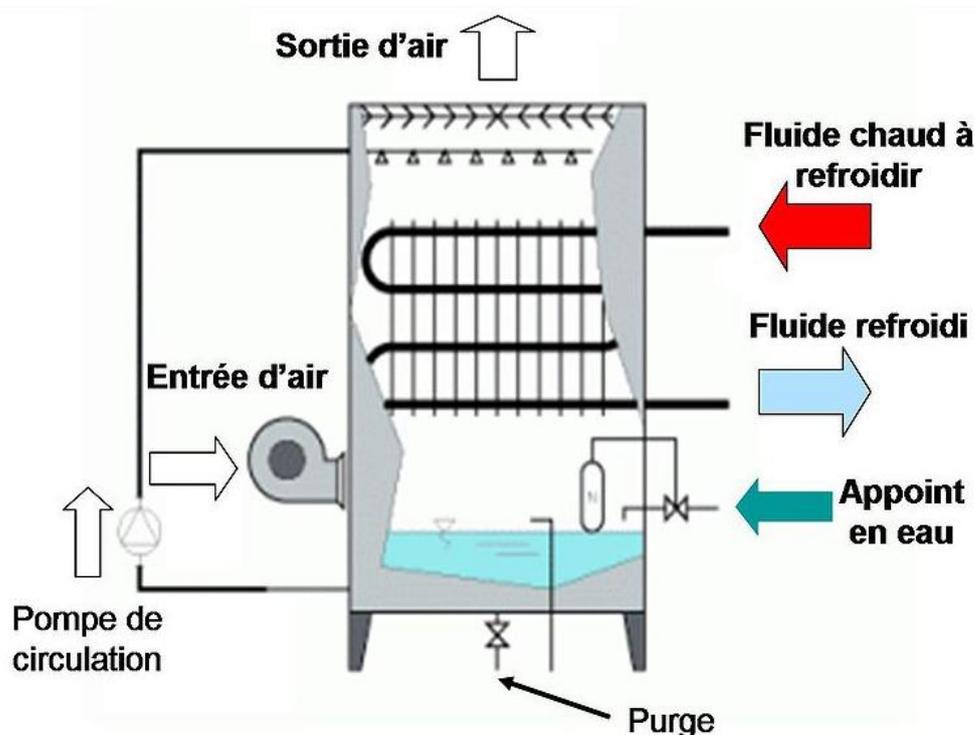


Figure 5 : Schéma d'une TAR par voie humide.
(d'après <http://installationsclassees.ecologie.gouv.fr>)

De très nombreuses épidémies à *Legionella* ont été associées à des TAR (Nhu Nguyen *et al.*, 2006 ; Brown *et al.*, 1999 ; Addiss *et al.*, 1989 ; Friedman *et al.*, 1987 ; Cordes et Fraser, 1980 ; Ishimatsu *et al.*, 2001) (Tableau 4).

Tableau 4 : Concentrations en *Legionella* retrouvées dans les TAR lors d'épidémies.

Références	Concentration en légionelles dans les TAR
Brown <i>et al.</i> , 1999	Entre $0,1.10^3$ et $9,2.10^3$ UFC/mL
Friedman <i>et al.</i> , 1987	$\sim 3.10^5$ bactéries/mL
Ishimatsu <i>et al.</i> , 2001	$\sim 1,2.10^3$ UFC/mL

2.1.2.3. Autres installations

Les piscines (récréatives ou thermales) et spas constituent un très bon habitat pour *Legionella* car ils sont maintenus à des températures favorisant leur croissance (Hedges et Roser, 1991). Ces installations peuvent produire des gouttelettes d'eau de taille respirable (inférieure à 5 μm) pouvant potentiellement transmettre *Legionella* à l'homme (Jernigan *et al.*, 1996 ; Benin *et al.*, 2002).

La bactérie est également retrouvée dans d'autres installations comme les fontaines décoratives (Correia *et al.*, 2001 ; Heng *et al.*, 1997 ; Hlady *et al.*, 1993), les machines à glace (Bangsborg *et al.*, 1995 ; Graman *et al.*, 1997), les nébulisateurs (Blatt *et al.*, 1993 ; Mahoney *et al.*, 1992 ; Woo *et al.*, 1986), des équipements de thérapie respiratoire et dentaire (Yu, 1993 ; Atlas *et al.*, 1995 ; Zanetti *et al.*, 2000) ou encore les humidificateurs (Zuravleff *et al.*, 1983 ; Mahoney *et al.*, 1992).

Pour finir, *Legionella* a été retrouvée dans des stations de traitement d'eaux usées. Palmer et ses collègues (1993) ont mis en évidence la présence de la bactérie au niveau de toutes les phases du processus de traitement de l'eau sans noter de diminution significative de la population bactérienne tout au long de ce processus. Peu de temps après, Palmer *et al.* (1995) ont détecté par PCR et immunofluorescence directe, la présence de *Legionella* même après l'étape de chloration. Cependant, les bactéries n'étant plus cultivables, ils émettent l'hypothèse que ce traitement conduit *Legionella* à l'état de bactérie viable non cultivable. Ceci a en effet été démontré lorsque la bactérie est soumise à un traitement oxydant (Bej *et al.*, 1991 ; Alleron *et al.*, 2008 ; Garcia *et al.*, 2007).

Pour finir, il est également important de souligner le paradoxe qui existe entre les nombreuses exigences de *Legionella* pour croître en laboratoire (L-cystéine, fer, pH, ...) (§ 1.4.) alors qu'elle montre des capacités extraordinaires à vivre dans des milieux oligotrophes (pauvres en éléments nutritifs) tels que l'eau potable ou encore dans des sols de différentes natures. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant (§ 1.2.2), *Legionella* est retrouvée dans des environnements dont les conditions de température, pH, oxygène dissous... sont très différentes des conditions de laboratoire et ne permettraient pas a priori sa croissance. Le premier à avoir mis en évidence ce paradoxe est Rowbotham (1980). Il a en effet noté la très large présence de légionelles dans des milieux hydriques dans lesquels les nutriments requis pour la croissance de *Legionella* en laboratoire sont rarement présents (en particulier la L-cystéine). C'est ainsi qu'il a émis l'hypothèse d'une interaction entre légionelles et amibes ; ces dernières constituant une niche écologique permettant aux légionelles de s'adapter aux conditions défavorables de l'environnement (Rowbotham, 1980). Cette hypothèse a été validée à plusieurs reprises par de nombreux auteurs (Abu Kwaïk *et al.*, 1997 ; Barker *et al.*, 1992 ; Barker *et al.*, 1995 ; Kilvington *et al.*, 1990) (§ 2.4). De même, l'existence de bactéries favorisant la croissance de *Legionella* dans le biofilm a également été décrite (Wadowsky *et al.*, 1983 ; Stout *et al.*, 1985) (§ 2.2.3.).

2.2. Survie de *Legionella* dans l'environnement

La détection de *Legionella* se fait classiquement par culture. Cependant, l'absence de croissance sur milieux de culture classiques n'est pas le signe d'une absence totale de bactéries dans l'échantillon. En effet, au sein d'une population bactérienne, il est concevable que la physiologie des cellules présente une hétérogénéité et se traduise par une gamme d'états allant des bactéries mortes à celles qui sont cultivables en passant par une fraction métaboliquement active mais ayant perdu temporairement leur capacité à cultiver ; elles se trouvent dans une phase de « survie » en attendant des conditions favorables à leur croissance. La compréhension des paramètres influençant leur survie peut s'avérer très utile dans le cadre d'une démarche de prévention vis-à-vis du risque lié aux légionelles ou de désinfection d'installations contaminées.

2.2.1. Facteurs influençant la survie de *Legionella* dans l'eau

Les populations bactériennes vivant dans les environnements aquatiques sont fréquemment exposées à de forts stress dus à des variations de température, teneur en oxygène, pH, salinité (Ohno

et al., 2003) voire de rayonnements solaires et ultraviolets (Dutka, 1984). Les paragraphes qui suivent décrivent la survie de *Legionella* selon les variations de ces paramètres.

2.2.1.1. Température

La température est probablement l'un des facteurs les plus importants gouvernant la survie et/ou la multiplication de *Legionella*. Même s'il est communément admis que *Legionella* se multiplie dans les milieux hydriques à des températures comprises entre 20°C et 45°C et qu'elle est capable d'y survivre entre 6°C et 66°C (Habicht et Muller, 1988 ; Wadowsky *et al.*, 1985 ; Fliermans *et al.*, 1981 ; Tison *et al.*, 1980) (Figure 6), elle serait capable, au regard de certaines études, de survivre dans une gamme de températures plus large encore. Pour preuve, elle a été détectée par immunofluorescence directe dans des eaux douces naturelles dont la température était comprise entre 0°C (rivière gelée) et 63°C (Bornstein et Fleurette, 1992 ; Fliermans *et al.*, 1981) et dans des eaux potables de 3-4°C à la sortie de station de potabilisation (Wullings et Van der Kooij, 2006).

Ohno et ses collaborateurs (2003) ont étudié la survie de *L. pneumophila* sg1 (souche Suzuky) dans des microcosmes d'eau de source chaude à différentes températures : 25°C, 42°C, 45°C et 50°C. Ils observent une décroissance rapide de la cultivabilité (environ 10 jours) au-delà de 45°C. Cependant, l'intégrité membranaire (évaluée au moyen du marquage BacLight), qui témoigne de la survie, est conservée durant les 61 jours d'expérimentation jusqu'à 45°C. A 50°C, cette intégrité membranaire n'est plus retrouvée après seulement 8 jours d'observation. D'autres auteurs travaillant sur la cultivabilité de *L. pneumophila* dans l'eau potable ont observé une perte de cultivabilité dès 25 jours d'incubation à 42°C (Wadowsky *et al.*, 1985), ce qui ne correspond pas aux résultats de Ohno *et al.* (2003). Ces divergences entre les études peuvent s'expliquer par des variations de conditions expérimentales, des souches de légionelles avec des états physiologiques différents, ...

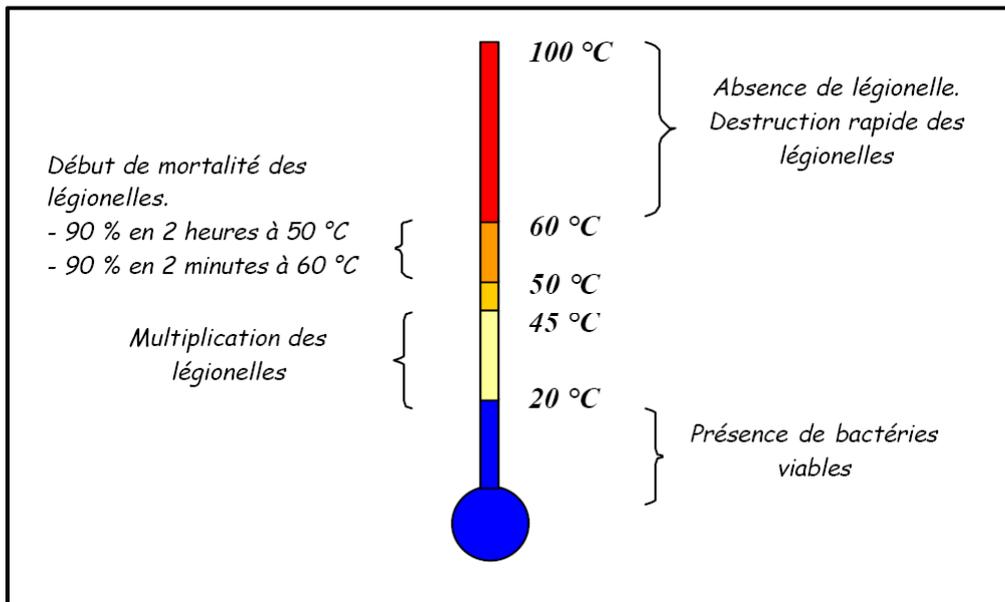


Figure 6 : Représentation schématique du comportement de *Legionella* en fonction de la température.
 (d'après Pecharman, 2002)

2.2.1.2. Teneur en oxygène dissous

Legionella étant une bactérie aérobie, dans une eau potable, sa multiplication est impossible si la teneur en oxygène dissous est inférieure à 2,2 mg/L (Wadowsky *et al.*, 1985). En effet, en condition anaérobie, la population bactérienne est diminuée d'1,7 log en 28 jours contre une augmentation d'1,6 log de *Legionella* en condition aérobie à 35°C (Figure 7).

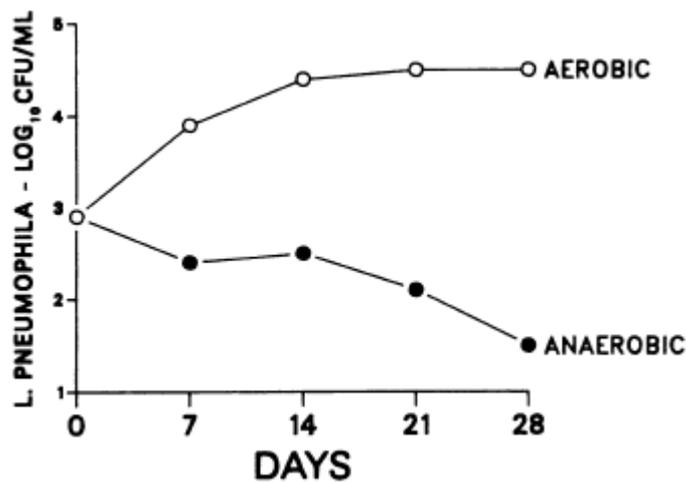


Figure 7 : Effet des conditions aérobie et anaérobie sur la croissance de *Legionella pneumophila* dans une eau à 35°C.
 (Wadowsky *et al.*, 1985)

A l'inverse, une teneur trop importante en oxygène dissous dans l'eau aurait un effet inhibiteur sur la cultivabilité des légionelles (Borella *et al.*, 2005 ; Fliermans *et al.*, 1981). En effet Fliermans et ses collègues (1981) montrent une diminution de celle-ci lorsque les teneurs en oxygène excèdent 5 mg/L d'oxygène dissous. Ceci a été confirmé plus récemment par Borella et ses collaborateurs (2005) : une teneur en oxygène dissous supérieure à 3 mg/L est protectrice face à la présence de *Legionella* cultivables dans les réseaux d'eau.

Cependant, ces résultats sont à nuancer puisque Fliermans *et al.* (1981) ont isolé des *L. pneumophila* cultivables d'échantillons d'eau provenant de lacs, puits et rivières dont les niveaux d'oxygène dissous variaient de 0,3 à 9,2 mg/L. Cela montre une fois de plus l'incroyable capacité d'adaptation dont peut faire preuve cette bactérie.

2.2.1.3. pH

Le pH constitue également un facteur important dans la survie des légionelles dans l'eau. Wadowsky *et al.* (1985) ont étudié son influence sur des échantillons d'eau potable prélevés dans des réservoirs d'eau chaude infectée par *Legionella*. Ils ont ajusté le pH de l'eau par ajout d'acide (HCl) ou de base (NaOH) et ont observé que la croissance de *Legionella* dans l'eau potable est possible pour des pH variant de 5,5 à 9,2 avec un optimal à 6,9 (Wadowsky *et al.*, 1985). Plusieurs études mettent en évidence, par le biais de l'analyse d'échantillons d'eau potable issus d'installations naturellement contaminées, la large gamme de pH dans laquelle peut survivre *Legionella* : de 6,4 à 8,5 (Leoni *et al.*, 2005 ; States *et al.*, 1987). Ohno et ses collaborateurs (2003) ont étudié la cultivabilité et la survie cellulaire (mesurée par l'intégrité membranaire) de *Legionella pneumophila* sg 1 introduites expérimentalement dans des échantillons d'eau de sources chaudes (42°C). Ils ont établi que *L. pneumophila* sg 1 n'était rapidement plus cultivable à pH 2 (environ 15 jours) ; la cultivabilité disparaît après 20 jours aux pH 5 et 10 malgré le maintien de la survie cellulaire sur toute la période de l'étude (61 jours). A pH 6 et 8, la cultivabilité de la bactérie inoculée dans l'eau de source chaude décline progressivement (Figure 8). Ainsi, leur étude montre une meilleure survie à pH 8, contrairement à Wadowsky *et al.* (1985) et Katz et Hammel (1987) qui situaient le pH optimal aux alentours de 7. Cette variabilité des données s'explique à nouveau probablement par des conditions opératoires différentes, ce qui rend la synthèse délicate.

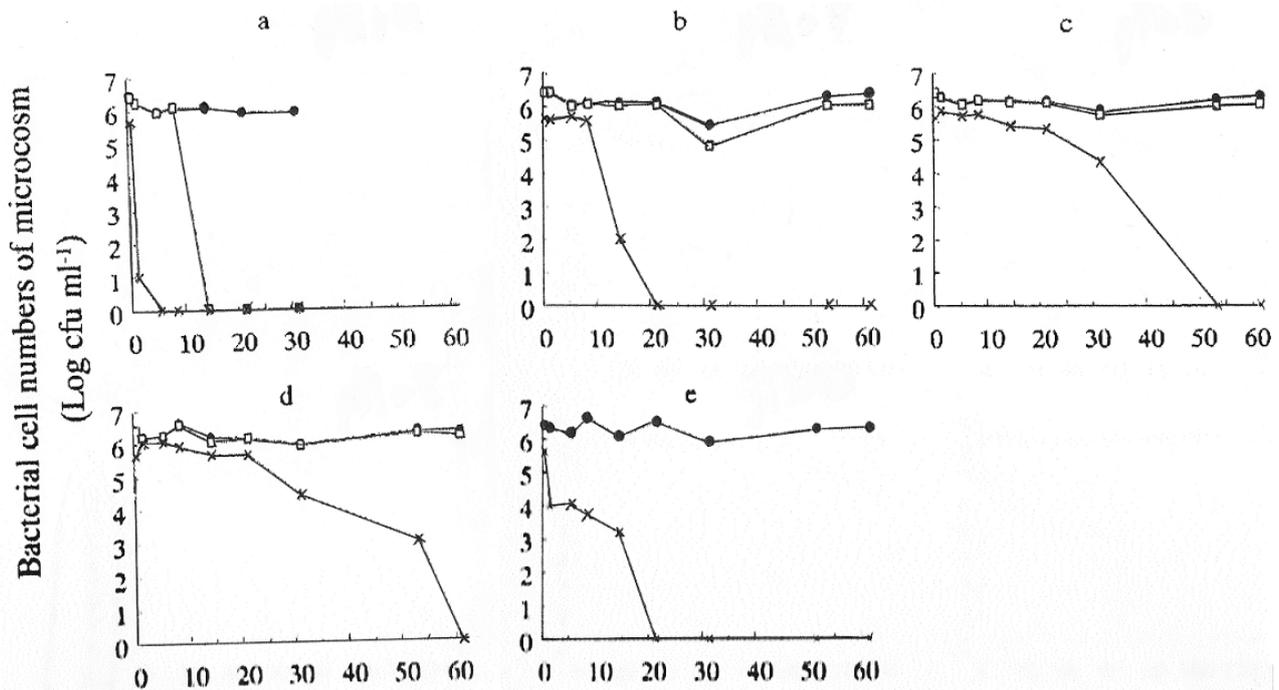


Figure 8 : Effet du pH sur la survie de *Legionella* en microcosme constitué d'eau de source chaude (42°C) : pH 2 (a), pH 5 (b), pH 6 (c), pH 8 (d), pH 10 (e).

(●, nombre total de cellules bactériennes ; □, nombre de cellules viables (apprécié par l'évaluation de l'intégrité membranaire à l'aide du marquage BacLight) ; ×, nombre de cellules cultivables) (Ohno *et al.*, 2003)

2.2.1.4. Salinité

La présence de *Legionella* dans les eaux salées a été peu étudiée et les quelques travaux recensés ne distinguent pas les bactéries métaboliquement actives ou non (Palmer *et al.*, 1993 ; Ortiz-Roque et Hazen, 1987). D'autres travaux ont porté sur l'effet conjugué de la salinité et de la température sur la croissance de *L. pneumophila*. Ils ont montré que pour des températures comprises entre 4°C et 20°C, les variations de concentration des sels ont peu d'influence sur la culture de *Legionella* (Heller *et al.*, 1998). Dans cette gamme de températures, *Legionella* est cultivable dans des solutions allant jusqu'à 3 % de salinité. Par contre, pour des températures plus élevées, entre 30°C et 37°C, les fortes concentrations en sels (supérieures à 1,5 %) provoquent une forte diminution du nombre de bactéries cultivables.

2.2.1.5. Rayonnement solaire

Les légionelles présentes en eau peu profonde verraient leur croissance affectée par le rayonnement solaire. On observe en effet un abattement de 5 log de *Legionella* cultivables après 6

heures d'exposition solaire naturelle (Dutka, 1984). Cette même étude a mis en évidence le fait que *Legionella* soit plus résistante dans l'eau que d'autres bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *E. coli* pour lesquelles la perte de cultivabilité est totale après respectivement 4 et 3 heures d'exposition solaire naturelle (Dutka, 1984). Cela s'est confirmé avec l'étude de Oguma *et al.* (2004). On y retrouve une moindre sensibilité des légionelles aux rayonnements U.V. par rapport à *E. coli*. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer cela. D'une part, *Legionella* possède une activité photolyase plus importante que *E. coli* et a la capacité de réparer son contenu pyrimidique plus rapidement (Oguma *et al.*, 2004). D'autre part, Tully (1991) a mis en évidence un plasmide conjugatif de 69 kb conférant aux souches de *L. pneumophila* une sensibilité moindre vis-à-vis des rayonnements U.V. par le biais de mécanismes encore inconnus.

2.2.1.6. Présence de minéraux

Il est en effet reconnu que les minéraux jouent un rôle important dans le métabolisme bactérien (Dawes, 1985). Néanmoins, concernant *Legionella*, aucune relation n'a été trouvée entre la présence de certains sels minéraux tels que Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} et la présence de *Legionella* dans l'eau (Devos *et al.*, 2005). Une première approche, initiée par States et ses collègues (1985), a cependant montré qu'un niveau faible de certains minéraux tels que le fer, le zinc et le potassium était un facteur important dans la survie et la multiplication de *L. pneumophila* dans l'eau du robinet. A l'inverse, des niveaux trop élevés (10 à 100 mg/L) de ces minéraux sont toxiques.

2.2.2. Survie dans l'air

Legionella est transmise à l'homme par le biais d'aérosols (ensemble de particules, solides ou liquides ou les deux, en suspension dans un milieu gazeux et présentant une vitesse de chute négligeable (par convention < 25 cm/s). Il n'en demeure pas moins que l'air constitue un environnement extrême pour la plupart des bactéries, entraînant une létalité importante de ces micro-organismes. Les quelques études menées dans le but de collecter et dénombrer les légionelles dans les aérosols sont répertoriées ci-dessous (Tableau 5).

Tableau 5 : Concentrations en légionelles dans l'air par différentes techniques d'analyses.

Site	Principe de collecte	Concentration dans l'air		Références
		Volume d'air échantillonné (L)	<i>Legionella</i> UFC/m ³	
Tour	Impaction liquide	240	2,3.10 ³	Breiman <i>et al.</i> , 1990b
	Impaction solide	810	— ¹	
Tour	Impaction solide	849	0	Ishimatsu <i>et al.</i> , 2001
	Impaction liquide	600	90	
Tour	Impaction liquide	40 000	0	Mathieu <i>et al.</i> , 2006
Tour	Impaction liquide	40 000	0	
Tour	Impaction liquide	40 000	0	
Tour	Impaction liquide	40 000	0	
Bassin	Impaction liquide	40 000	5,4.10 ³	
Bassin	Impaction liquide	40 000	3,3.10 ²	
Douche	Impaction solide	ND	190	Breiman <i>et al.</i> , 1990a
Douche	Impaction solide	ND	60	
Douche	Impaction liquide	7 500	0,27	Dennis <i>et al.</i> , 1984
Douche	Impaction liquide	7 500	0,4	
Douche	Impaction solide	850	6	Bollin <i>et al.</i> , 1985
Douche	Impaction solide	850	3,5	
Bassin	Impaction liquide	Entre 19 500 et 39 000	de 1,7 à 3 300	Blatny <i>et al.</i> , 2008

Très peu de travaux, et pour la plupart assez anciens, font état des dommages et/ou de l'action au niveau cellulaire subis par les *Legionella* aérosolisées face aux conditions environnementales. D'autre part, ces essais sont réalisés sur des souches pures et dans des conditions de laboratoire que l'on sait très éloignées des conditions environnementales. On peut noter entre autres la présence dans l'environnement de matières organiques ou inorganiques qui pourraient jouer un rôle important dans la survie des légionelles aérosolisées. Enfin, chez *Legionella*, il semblerait que les effets dus à des stress environnementaux soient variables en fonction des espèces et sérogroupes (Dennis *et al.*, 1988). La survie dans un aérosol généré, mesurée par l'intégrité membranaire des légionelles, est accrue pour la souche épidémique Lens (*L. pneumophila* sg1) par rapport à l'espèce *L. pneumophila* sg 6 (souche environnementale) : après 70 heures d'études de survie, 80 % de l'aérosol de la souche Lens a une intégrité membranaire intacte

contre seulement 10 % pour *L. pneumophila* sg 6. (Ha, 2005). Cependant, il n'a été décelé aucune différence quant à leur capacité à cultiver suite à l'aérosolisation. De plus, une étude a montré des survies dans l'air très différentes entre *L. pneumophila* sg 1, *L. micdadei* et *L. bozemanii* (Figure 9), les deux dernières ayant une meilleure survie que *L. pneumophila* dans les conditions expérimentales utilisées.

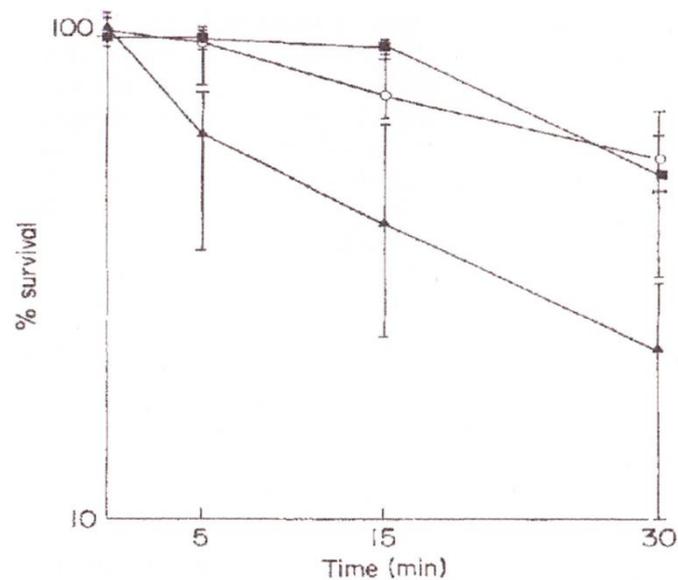


Figure 9 : Comparaison de la survie dans l'air de *L. pneumophila* sg 1 (▲), *L. micdadei* (■) et *L. bozemanii* (○) à 60 % d'humidité relative et 20°C. (Dennis et Lee, 1988)

Les stress de l'environnement auxquels sont soumis les bioaérosols ont été décrits par Hambleton *et al.* (1983) et Cox (1989) : l'état physiologique de la bactérie, l'humidité relative de l'air, la température, l'oxygène, l'ozone, les rayonnements U.V., rayons γ et rayons X.

2.2.2.1. Phase de croissance de la bactérie

L'influence de l'état physiologique des bactéries aérosolisées sur leur survie dans le milieu aérien a été étudiée par Hambleton et ses collègues (1983). Ils ont étudié l'effet de l'activité métabolique des bactéries aéroportées sur leur survie en termes de cultivabilité. Ainsi, les travaux ont porté sur des bactéries en phase stationnaire de croissance et d'autres en phase exponentielle de croissance. Il s'est avéré que des suspensions aqueuses de souche pure de *L. pneumophila* sont plus stables dans les aérosols lorsque la bactérie est en phase stationnaire de croissance.

2.2.2.2. Humidité

Au travers de quelques études sur des souches pures en laboratoire, il s'est avéré que la survie des légionelles dans un aérosol était très influencée par le taux d'humidité environnant la bactérie. Les études de survie de la bactérie dans les aérosols ont montré une persistance accrue de *Legionella* lorsque l'humidité relative (H.R.) de l'air était de 60 %, allant, selon les auteurs, de 1 à 30 minutes (Dennis et Lee, 1988 ; Hambleton *et al.*, 1983 ; Berendt, 1980). Hambleton *et al.* (1983) observent qu'un tiers de la population bactérienne reste cultivable à 20°C et 65 % d'H.R. pendant 30 minutes après aérosolisation et que dans ces conditions, elles peuvent survivre au moins 2 heures.

2.2.2.3. Oxydants de l'air

La plupart des bactéries aérosolisées sont sensibles aux effets de l'oxygène de l'air (Israeli *et al.*, 1994). Aucune étude n'ayant traité ces effets sur *Legionella*, nous exposerons quelques unes des données concernant d'autres micro-organismes.

La toxicité de l'O₂ augmente avec le temps d'exposition, le degré d'humidité relative et la concentration en oxygène (Israeli *et al.*, 1994). L'effet létal de l'O₂ qui est maximum à une concentration de 30 % a été observé pour un taux d'H.R. inférieur à 70 % (Hess, 1965 ; Cox, 1989).

De plus, l'ozone présente un caractère létal pour les micro-organismes aérosolisés en fonction du taux d'oléfines (hydrocarbure insaturé comprenant au moins une double liaison carbone-carbone) dans l'atmosphère. L'O.A.F. ou « *Open Air Factor* » désigne l'ensemble des produits de réactions toxiques de l'ozone-oléfines. L'O.A.F. réagit avec les acides gras pour former des substances toxiques comme les hydroperoxydes ; sa toxicité pour une bactérie est donc directement liée à la proportion de lipides contenus dans sa paroi. Or, du fait de la riche composition en lipides de leur paroi, les bactéries à Gram négatif seraient plus sensibles aux O.A.F. (Cox, 1989).

2.2.2.4. Rayonnements solaires

Qu'il s'agisse de rayonnements X, γ ou U.V., tous ont un effet délétère sur les cellules bactériennes en provoquant des réactions radicalaires altérant les acides nucléiques (Cox, 1989). A plusieurs reprises il a été observé un meilleur taux de survie des bactéries aérosolisées en l'absence de rayonnement solaire : la cultivabilité variait d'un facteur 2,6 à 8,3 selon que l'aérosol subissait ou non ces rayonnements (Goff *et al.*, 1973 ; Fedorak et Westlake, 1978). Dans le même sens, Ha (2005) a observé qu'une exposition à une dose d'U.V. -A d'environ 30 W/m² (exposition solaire

d'une journée hivernale) engendre une perte de cultivabilité de 83 % de l'aérosol de *Legionella* comparé à un aérosol soumis à l'obscurité.

2.2.3. Survie dans les biofilms

Un biofilm se définit comme un ensemble de micro-organismes associés à une matrice de polymères extracellulaires (E.P.S.), adhérant à une surface (Donlan, 2001 ; Costerton *et al.*, 1995). En effet, les micro-organismes ont une tendance naturelle à se développer préférentiellement sur une surface plutôt qu'en suspension. Un biofilm est une structure organisée qui présente cependant des hétérogénéités spatiales et physiologiques. La formation d'un biofilm est un processus dynamique qui se déroule en plusieurs étapes : le transfert et le dépôt de bactéries sur un support via des mécanismes physico-chimiques, puis les phénomènes biologiques prennent le pas et une croissance de cellules adhérentes se produit ; enfin, des phénomènes de détachement se produisent notamment à la faveur de conditions hydrodynamiques (cisaillement). La production des polymères extracellulaires intervient dès les premiers moments du dépôt sur la surface et est régulée génétiquement (Lejeune, 2003). Le biofilm est exclusivement lié à un processus bactérien, mais d'autres micro-organismes y adhèrent : virus, algues, protozoaires, champignons. Au final, la multiplication cellulaire et les différenciations phénotypiques aboutissent à l'élaboration d'un biofilm mature, et structuré (Stoodley *et al.*, 2002) (Figure 10). Il est alors composé de microcolonies confluentes séparées par des canaux permettant la diffusion et l'apport de nutriments et d'oxygène (Costerton *et al.*, 1995). L'organisation, la forme, la densité de ces assemblages structurés mais hétérogènes sont modulées par les variations des conditions environnementales.

La présence de *Legionella* dans un biofilm favorise sa survie (Temmerman *et al.*, 2006 ; Murga *et al.*, 2001 ; Rogers *et al.*, 1994) . Quelques études ont tenté d'expliquer ce phénomène. D'une part, il est probable que l'existence de protozoaires dans ces biofilms, du fait des capacités de multiplication intracellulaire de *Legionella*, est un élément en faveur de la présence de cette bactérie. Dans ce sens, Murga *et al.* (2001) ont étudié l'importance de *Hartmannella vermiformis* sur la survie et la croissance de *Legionella* en biofilm dans une eau potable stagnante. Après des essais sur 15 jours d'incubation, ils en concluent que cette amibe n'est pas indispensable à la présence de *L. pneumophila* dans le biofilm mais qu'elle l'est à sa multiplication.

De plus, le biofilm assure un rôle de niche protectrice vis-à-vis des désinfectants (Hall-Stoodley et Stoodley, 2005 ; Lejeune, 2003 ; Cargill *et al.*, 1992). En effet, l'activité des désinfectants comme le chlore est moins efficace contre les bactéries du biofilm que les bactéries en suspension du fait de leur accessibilité moindre dans le biofilm (Green et Pirrie, 1993 ; Green, 1993). De plus, Williams et Braun-Howland (2003) ont mis en évidence la persistance de l'activité

physiologique de *Legionella* au niveau d'un biofilm par hybridation *in situ*, aussi bien avant qu'après un traitement à la monochloramine (4 mg/L pendant 155 minutes).

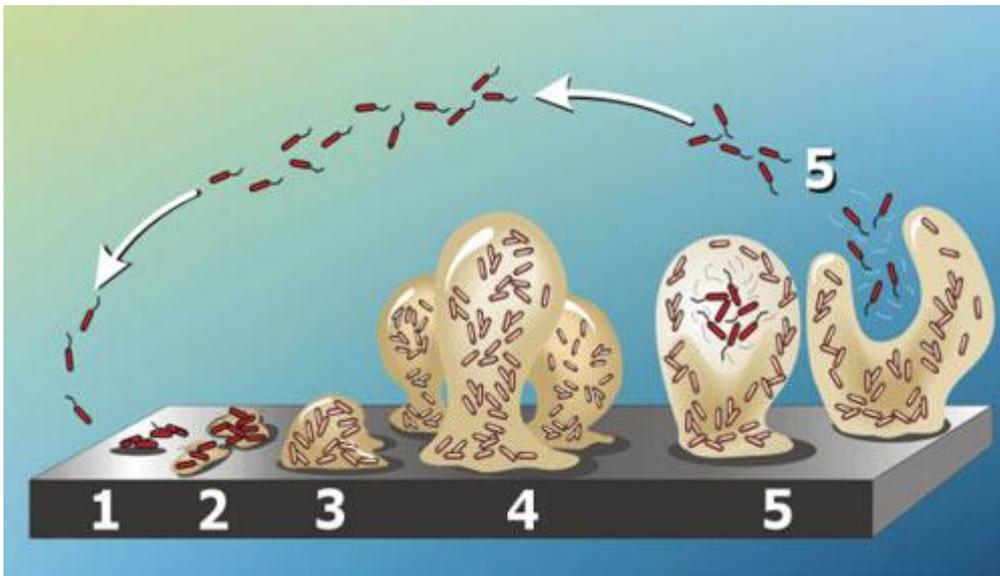


Figure 10 : Cycle de vie du biofilm.

(Stoodley *et al.*, 2002)

(1) : Colonisation individuelle des cellules sur la surface. (2) : Production d'E.P.S. et attachement irréversible. (3) et (4) : Développement et maturation de la structure du biofilm. (5) : Relargage de cellules isolées à partir du biofilm.

2.3. Interactions avec d'autres espèces bactériennes

Les interactions de *Legionella* avec d'autres espèces bactériennes ont été décrites à plusieurs reprises. Elles peuvent potentialiser ou à l'inverse inhiber la croissance des légionelles (par des relations de type amensalisme, compétition ou de type parasitisme).

2.3.1. Inhibition

Certaines espèces bactériennes présentes dans l'environnement sont défavorables à la croissance de *Legionella*. Certaines d'entre elles peuvent inhiber sa multiplication par la synthèse de métabolites bactéricides et/ou bactériostatiques (amensalisme, cf glossaire) ou encore au moyen d'une activité prédatrice vis-à-vis des légionelles (parasitisme).

2.3.1.1. Inhibition par bactéricidie

Plusieurs travaux ont montré l'existence d'espèces bactériennes capables d'inhiber la croissance de *Legionella* (Tableau 6) tant dans les biofilms (Guerrieri *et al.*, 2008) que sur des milieux de culture classiquement utilisés dans la culture des légionelles (Toze *et al.*, 1990 ; Héchard *et al.*, 2005). Les différentes études évoquées par la suite émettent l'hypothèse ou confirment que cette inhibition serait due à l'existence de peptides inhibiteurs, sécrétés par un grand nombre de bactéries.

Tableau 6 : Bactéries capables d'inhiber la croissance de *Legionella*.

Références	Bactéries inhibant la croissance de <i>Legionella</i>	Agents responsables de l'inhibition
Toze <i>et al.</i> , 1990	<i>Aeromonas</i> <i>Pseudomonas vesicularis</i> <i>Vibrio fluvialis</i>	
Héchard <i>et al.</i> , 2005	<i>Staphylococcus warneri</i>	Peptides inhibiteurs « Anti- <i>Legionella</i> »
Guerrieri <i>et al.</i> , 2008	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Alcaligenes faecalis odorans</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Flavobacterium spp.</i>	BLSs (Bacteriocin-like substances)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	
Carrington, 1979	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Bacillus spp.</i> streptocoques du groupe <i>viridans</i>	

Toze et ses collaborateurs (1990) ont étudié l'inhibition que pouvait exercer une centaine d'espèces bactériennes présentes naturellement dans un réseau de distribution d'eau sur la croissance de *Legionella* en milieu gélosé (BCYE). Ils ont observé que 15 à 30 % d'entre elles inhibaient la croissance d'au moins une des huit espèces de *Legionella* testées (*L. pneumophila* (Philadelphia 1), *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae*, *L. micdadei*,

L.oakridgensis et *L. wadsworthii*). Les dix espèces appartenant au genre *Aeromonas* et un *Brevundimonas vesicularis* étaient inhibiteurs de la cultivabilité de toutes les espèces de légionelles, probablement par le biais de substances inhibitrices qui n'ont pas été identifiées.

Une étude de Héchard et ses collaborateurs (2005) a confirmé l'hypothèse de sécrétion de substances bactéricides en prouvant que *Staphylococcus warneri* sécrétait un peptide inhibiteur de différentes souches de *Legionella* (*Legionella bozemanii*, *Legionella dumofii*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila* Corby, *Legionella pneumophila* Lens et *Legionella pneumophila* Paris).

Ce phénomène d'inhibition soulève un problème quant à la détection de *Legionella* dans les échantillons d'eau environnementaux. En effet, la présence d'espèces bactériennes capables d'inhiber la croissance de *Legionella* sur gélose peut aboutir à des résultats faussement négatifs (Makin, 1986).

2.3.1.2. Parasitisme

A ce jour, le seul parasite identifié des légionelles est l'espèce *Bdellovibrio bacteriovorus* (Tomov *et al.*, 1982 ; Richardson, 1990). C'est une bactérie présente dans les sols et les eaux contaminées. Elle possède la particularité de se multiplier lentement entre la paroi et la membrane cytoplasmique (bdellokyste) de la bactérie cible avant d'être libérée dans l'environnement par éclatement de la cellule parasitée. Une étude menée par Richardson (1990) a prouvé que des *Bdellovibrio* étaient présents dans les réseaux d'eau et qu'ils étaient en mesure de parasiter les légionelles qui s'y trouvaient.

2.3.2. Potentialisation

La découverte de l'effet de potentialisation de certaines espèces sur *Legionella* s'est faite grâce à des essais de co-culture sur gélose BCYE sans L-cystéine. En effet, des colonies de légionelles apparaissaient autour des colonies de l'espèce potentialisatrice. De nombreux auteurs ont travaillé à identifier ces espèces. On compte parmi elles *Flavobacterium breve* (Wadowsky *et al.*, 1983), *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* (Stout *et al.*, 1985)...

De plus, des cyanobactéries appartenant aux genres *Fisherella* spp., *Oscillatoria* spp. et *Phormidium* spp. sont capables de fournir les nutriments nécessaires à la croissance extracellulaire des légionelles dans l'environnement ; le CO₂ produit par *Legionella* serait utilisé par ces micro-organismes photosynthétiques (Tison *et al.*, 1980 ; Bohach et Synder, 1983). Par ailleurs, il a

également été démontré que *L. pneumophila* adhère de manière non spécifique à *Fisherella* spp., ce qui lui permettrait de rester à proximité de cette source de nutriments (Bohach *et al.*, 1983). Cette association avec les cyanobactéries pourrait jouer un rôle important dans la très large répartition de *Legionella* dans les environnements naturels. En effet, elles sont capables de proliférer en grandes quantités dans les bassins d'eau stagnante (barrages, étangs, rivières...) libérant ainsi de grandes quantités de métabolites potentiellement utilisables par les légionelles.

2.4. Interactions avec des espèces eucaryotes

De nombreuses espèces de protozoaires pouvant servir d'hôte aux légionelles ont été répertoriées, que ce soient des amibes ou autres protozoaires ciliés. Cela pourrait expliquer que cette espèce soit largement répandue dans l'environnement. L'adaptation vis-à-vis des eucaryotes, quant à elle, pourrait expliquer le fait que *L. pneumophila* soit l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infections de légionelles chez l'homme.

De nombreux auteurs suggèrent que les légionelles ne peuvent se répliquer dans les réseaux qu'à l'intérieur des protozoaires et avancent que même si les nutriments indispensables à leur croissance peuvent être réunis dans une même niche écologique, il est probable que celle-ci soit colonisée par des bactéries à croissance rapide qui ne permettront pas le développement des légionelles (Fields *et al.*, 2002). Plusieurs faits viennent supporter l'hypothèse d'une croissance intracellulaire obligatoire (Abu Kwaik *et al.*, 1998) :

- beaucoup de protozoaires permettent la répllication bactérienne intracellulaire (Harb *et al.*, 2000 ; Fields *et al.*, 1996 ; Abu Kwaik *et al.*, 1998),
- dans des cas d'épidémies, *Legionella pneumophila* et amibes ont été isolées d'une même source et supportent la croissance de celle-ci (Barbaree *et al.*, 1986 ; Nahapetian *et al.*, 1991),
- les amibes augmentent la résistance bactérienne dans les conditions difficiles (température, acidité, haute osmolarité) (Abu Kwaik *et al.*, 1997),
- les amibes augmentent la résistance des légionelles aux biocides et aux antibiotiques (Barker *et al.*, 1992 ; Barker *et al.*, 1995 ; Kilvington *et al.*, 1990),
- les protozoaires libèrent des vésicules contenant des bactéries (vésicules de taille respirable et très résistantes) (Berk *et al.*, 1998),
- les protozoaires pourraient jouer un rôle de cofacteurs dans la pathogénèse de l'infection pulmonaire induite par les légionelles, conduisant à l'aggravation de l'infection (Brieland *et al.*, 1997a),

- le nombre de légionelles isolées à partir de la source d'infection étant généralement faible, il serait compensé par une infectiosité beaucoup plus élevée des bactéries (O'Brien *et al.*, 1993),
- les légionelles à l'état viable non cultivable peuvent être ressuscitées par co-culture avec les protozoaires (Steinert *et al.*, 1997).

2.4.1. Amibes

Dans l'environnement, les amibes constituent une véritable niche écologique permettant aux légionelles de s'adapter aux conditions défavorables auxquelles elles sont confrontées. C'est Rowbotham qui, le premier, a supposé cette interaction suite à l'observation de légionelles détectées dans les milieux hydriques tandis que la combinaison de nutriments requise pour les faire croître en laboratoire (besoin en L-cystéine) est rarement présente dans l'eau (Rowbotham, 1980). On distingue au moins 13 espèces d'amibes dans lesquelles peuvent se multiplier les légionelles : *Acanthamoeba* sp., *Didasculus* sp., *Echinamoeba* sp., *Hartmannella* sp., *Mayorella* sp., *Naegleria* sp., *Schizopyrenus* sp., *Vahlkampfia* sp... Toutes ont été isolées de systèmes contaminés par *Legionella* (Abu Kwaik *et al.*, 1998; Bozue & Johnson, 1996; Steinert *et al.*, 2002). Parmi ces espèces, *Hartmannella* et *Acanthamoeba* ont été les plus étudiées car soupçonnées d'être plus souvent associées à des cas de maladie du légionnaire.

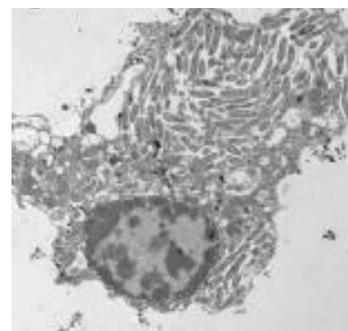


Figure 11 : Dernier stade de la multiplication de *Legionella pneumophila* dans l'amibe *A. polyphaga*. (Molmeret *et al.*, 2004)

La multiplication dans ces amibes est très efficace puisqu'une seule amibe infectée peut libérer plusieurs centaines de légionelles (Figure 11). Les légionelles sont capables de survivre dans les kystes d'*Acanthamoeba*, à l'intérieur desquels elles sont protégées vis-à-vis de conditions environnementales défavorables (Kilvington *et al.* 1990). Elles sont plus rarement retrouvées dans les kystes d'*Hartmannella*, dans lesquels elles sont localisées au niveau de la paroi (Greub *et al.* 2003). Une étude réalisée sur les espèces *L. gormanii*, *L. micdadei*, *L. steigerwaltii*, *L. longbeachae*, et *L. dumoffii* montre que leur répllication dans les cellules Mono Mac 6 (cellules macrophagiques humaines) était améliorée en présence d'*A. castellanii* (Neumeister *et al.*, 2000). Cette amélioration n'est pas observée si les légionelles proviennent directement d'amibes infectées. Les auteurs suggèrent que des molécules sécrétées par les amibes seraient impliquées dans ce phénomène. Une autre amibe du genre *Naegleria*, elle aussi très répandue dans les eaux de surface, comprend plusieurs espèces pouvant supporter la multiplication des légionelles. Molmeret *et al.* (2001) ont

montré que l'une de ces espèces, *Willaertia*, présente la capacité de phagocyter des amibes appartenant au genre *Hartmannella*, et que si celles-ci sont infectées par des légionelles, l'infection sera transmise à *Willaertia* spp. : les légionelles survivent donc aux deux phagocytoses successives.

Enfin, une espèce particulière d'amibe peut également, sous certaines conditions, servir d'hôte à *L. pneumophila*. Il s'agit de l'espèce *Dictyostelium discoideum* (Figure 12). La capacité de *L. pneumophila* à se développer dans ce protozoaire est fonction de son mode de croissance : la multiplication des légionelles sera possible si *Dictyostelium discoideum* croît en monocouche adhérente à un support mais pas si sa croissance se fait en suspension (Solomon *et al.*, 2000). Si les nutriments viennent à manquer, ces amibes présentent la particularité de pouvoir s'agréger et se différencier en éléments pluricellulaires ("fruiting bodies") portant des spores matures.



Figure 12 : Image en microscopie électronique de *Dictyostelium Discoideum*. (Grimson et Blanton. Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University)

L'infection des amibes par *Legionella* se produit en trois phases (Figure 14):

- l'adhésion et l'entrée de la bactérie dans l'amibe :

Les mécanismes d'interaction entre les bactéries et la cellule hôte sont mal connus. L'interaction serait issue de la fixation de ligands bactériens, tels que les pili, à des récepteurs de surface de la cellule hôte (Abu Kwaik *et al.*, 1998). Il a également été décrit l'implication d'une lectine spécifique (galactose/n-acétylgalactosamine) dans l'attachement de *Legionella pneumophila* aux amibes *H. vermiformis* (Venkataraman *et al.*, 1997) et *Naegleria lovaniensis* (Declerck *et al.*, 2007). Chez *Acanthamoeba castellanii*, c'est la lectine MBP (*mannose binding lectin*) qui serait impliquée (Declerck *et al.*, 2007). Une fois le premier contact amibe-légionelle amorcé, l'entrée de la bactérie dans l'amibe se fait :

- par phagocytose conventionnelle (décrit pour *H. vermiformis* (Abu Kwaik, 1996)) faisant intervenir les récepteurs et facteurs du complément (Bozue et Johnson, 1996 ; Cirillo *et al.*, 1999),

- ou par phagocytose par enroulement (ou *coiling phagocytosis*) qui fait intervenir un pseudopode s'enroulant autour de la bactérie (décrit pour *A. castellanii*, (Bozue et Johnson, 1996)) (Figure 13). Les mécanismes sont encore méconnus (Horwitz, 1984).

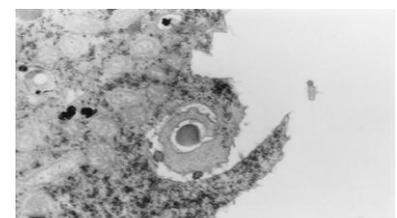


Figure 13 : Phagocytose par enroulement de *Legionella pneumophila* par *A. castellanii*. (Bozue et Johnson, 1996)

- la multiplication intracellulaire :

Après son entrée dans l'amibe, la bactérie se trouve à l'intérieur d'un phagosome associé à des organelles de la cellule hôte telles que des mitochondries, vésicules et membrane issue du réticulum endoplasmique (Abu Kwaik, 1996 ; Swanson et Isberg, 1993 ; Horwitz, 1984). Seulement 4 heures après l'internalisation de la bactérie et la formation de la vacuole de phagocytose, la multiplication de la bactérie débute. En parallèle les légionelles échappent à la fusion phagosome-lysosome (systèmes de destruction habituellement mis en place par ces hôtes pour digérer les bactéries). Ceci est rendu possible par l'existence chez les légionelles de gènes *dot* (*defective in organelle trafficking*) et/ou *icm* (*intracellular multiplication*) codant pour un système de sécrétion de type IV. Ce système permet la synthèse et la translocation de molécules effectrices (RalF, LidA, DotA...) dans le cytoplasme de la cellule hôte (Bruggemann *et al.*, 2006), modulant ainsi les propriétés du phagosome et inhibant la fusion phagosome-lysosome (Cianciotto, 2001). De ce fait, *Legionella* est protégée et peut se développer, d'abord dans le phagosome puis dans le cytoplasme aux dépens de la cellule hôte.

- la lyse de la cellule hôte et le relargage des bactéries :

Après 36 à 48 heures d'infection, la vacuole de phagocytose emplit la quasi-totalité de la cellule hôte et contient un nombre important de bactéries. La lyse de la vésicule de phagocytose est la résultante d'un ensemble de facteurs liés à un phénomène d'apoptose¹, de nécrose² (par le biais du système de sécrétion de type IV) et à une pression mécanique (Kirby *et al.*, 1998). Molmeret *et al.* (2004) ont montré que les bactéries étaient alors dispersées, parmi les mitochondries et vésicules, dans le cytoplasme de la cellule. Cela ne semble d'ailleurs pas perturber la réplication de *Légionella* dans la cellule hôte. Les légionelles seront ensuite libérées dans l'environnement et pourront donc de nouveau coloniser des biofilms, infecter d'autres amibes ou contaminer l'Homme. Le parasitisme des protozoaires par les légionelles permet une pollution importante du milieu extérieur.

¹ L'apoptose se définit comme un programme de mort par « suicide » d'une cellule hôte (macrophage, cellule alvéolaire, monocyte).

² La nécrose induit la mort de la cellule par la formation de pores.

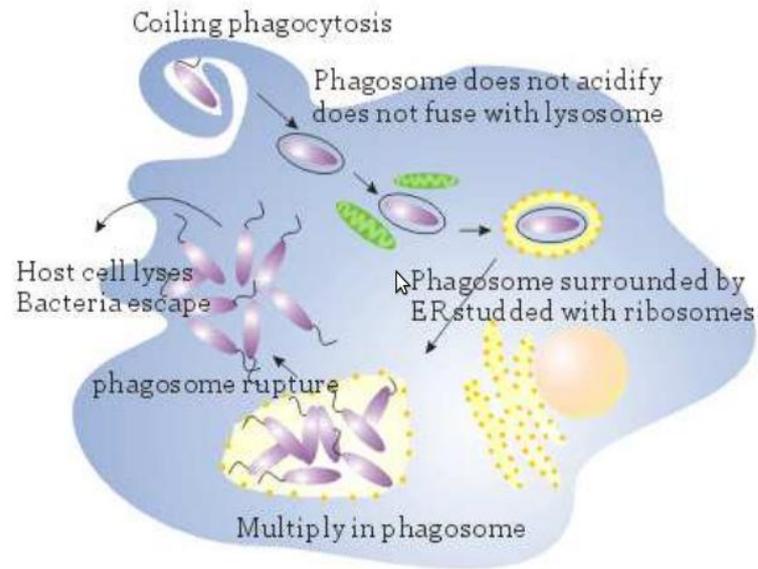


Figure 14 : Schéma d'infection d'une amibe par *Legionella*.
(<http://www.mgc.ac.cn>)

2.4.2. Protozoaires ciliés

D'autres protozoaires que les amibes sont susceptibles d'être infectés par *Legionella*. Il s'agit de trois espèces de ciliés : *Cyclidium sp.*, *Tetrahymena pyriformis* et *Tetrahymena vorax* (Barbaree *et al.*, 1986 ; Smith- Somerville *et al.*, 1991; Steele *et al.*, 1996). Selon les espèces, on les retrouvera plutôt dans des eaux froides (20°C) (genre *Tetrahymena*) ou chaudes (30°C) (*T. pyriformis*) (Smith- Somerville *et al.*, 1991 ; Nahapetian *et al.*, 1991). Smith-Somerville (1991) a observé une croissance à 30°C de *L. longbeachae*, de *L. bozemanii*, et de plusieurs souches de *L. anisa* dans les protozoaires du genre *Tetrahymena*. Par contre, la multiplication de certaines souches de *Legionella* était beaucoup moins efficace (*L. pneumophila* séro groupe 1) voire impossible (*L. micdadei* et la souche *L. anisa* ATCC 35292) (Steele *et al.*, 1996). Néanmoins, la croissance de *L. pneumophila* dans ce protozoaire peut être améliorée par des températures plus élevées : à 35°C la population de légionelles augmente de 2 à 3 logarithmes en 7 jours (Fields *et al.*, 1984). *T. vorax* permet la survie de *L. pneumophila* à 20°C dans des vacuoles de phagocytose (Smith-Somerville *et al.*, 1991). Enfin, MacNealy *et al.* (2002) mettent en évidence la capacité de *Tetrahymena spp.* à concentrer et relarguer les légionelles issues d'une multiplication intra-amibienne dans des vésicules.

3. La voie de transmission

3.1. Mode de transmission

Etant donné la large prévalence de *Legionella* dans l'environnement, il est primordial de comprendre les circonstances de la présence de cette bactérie dans les voies respiratoires d'un individu, potentiellement à l'origine d'une pneumopathie grave. De plus, les connaissances concernant les principaux réservoirs de *Legionella* et les voies de transmission à l'homme seront utiles à la mise en place de mesures préventives plus adaptées.

Legionella est transmise directement de l'environnement à l'homme. Aucune contamination inter-humaine n'a jamais été décrite et aucun réservoir animal n'est actuellement répertorié (Benhamou *et al.*, 2005). L'inhalation d'aérosols infectieux issus de réservoirs hydriques contenant la bactérie constitue l'unique voie de contamination aujourd'hui décrite (Fields *et al.*, 2002). Selon Green et Lane (1957), la notion d'« aérosol » est apparue à la fin de la première guerre mondiale et a été considérée comme l'équivalent d'une suspension liquide colloïdale. La taille des particules biologiques influence leur propension à pénétrer dans l'arbre bronchique : plus les particules sont petites, plus la pénétration dans les poumons est profonde ; les particules excédant 5 µm de diamètre sont retenues à l'entrée de l'appareil respiratoire (Druett *et al.*, 1953 ; Harper et Morton, 1953). Par ailleurs, ces particules doivent posséder un diamètre supérieur à 2 µm afin de pouvoir contenir une ou plusieurs particules bactériennes (Baron et Willeke, 1986). Aussi, concernant les risques de maladie du légionnaire, la taille des aérosols est aussi importante que la concentration en légionelles dans l'air ambiant.

Quelques contaminations par « fausse route alimentaire » (aspiration lors d'ingestion d'eau) ont été décrites chez des patients après chirurgie oncologique réalisée au niveau de la tête et du cou. Il pourrait se former un aérosol lors de ces « micro-aspirations » (Graman *et al.*, 1997). Comme nous l'avons vu précédemment (§ I.2.1.1.), la manipulation de terreau aurait été à l'origine de cas de maladie du légionnaire en Australie et aux Etats-Unis (Montanaro-Punzengruber *et al.*, 1999 ; CDC, 2000).

Tout au long du schéma de transmission de *Legionella* de l'environnement à l'homme, une multitude de facteurs conditionnant la réussite de celle-ci interviennent. Ils peuvent être liés tant à l'environnement qu'à l'individu lui-même (Figure 15).

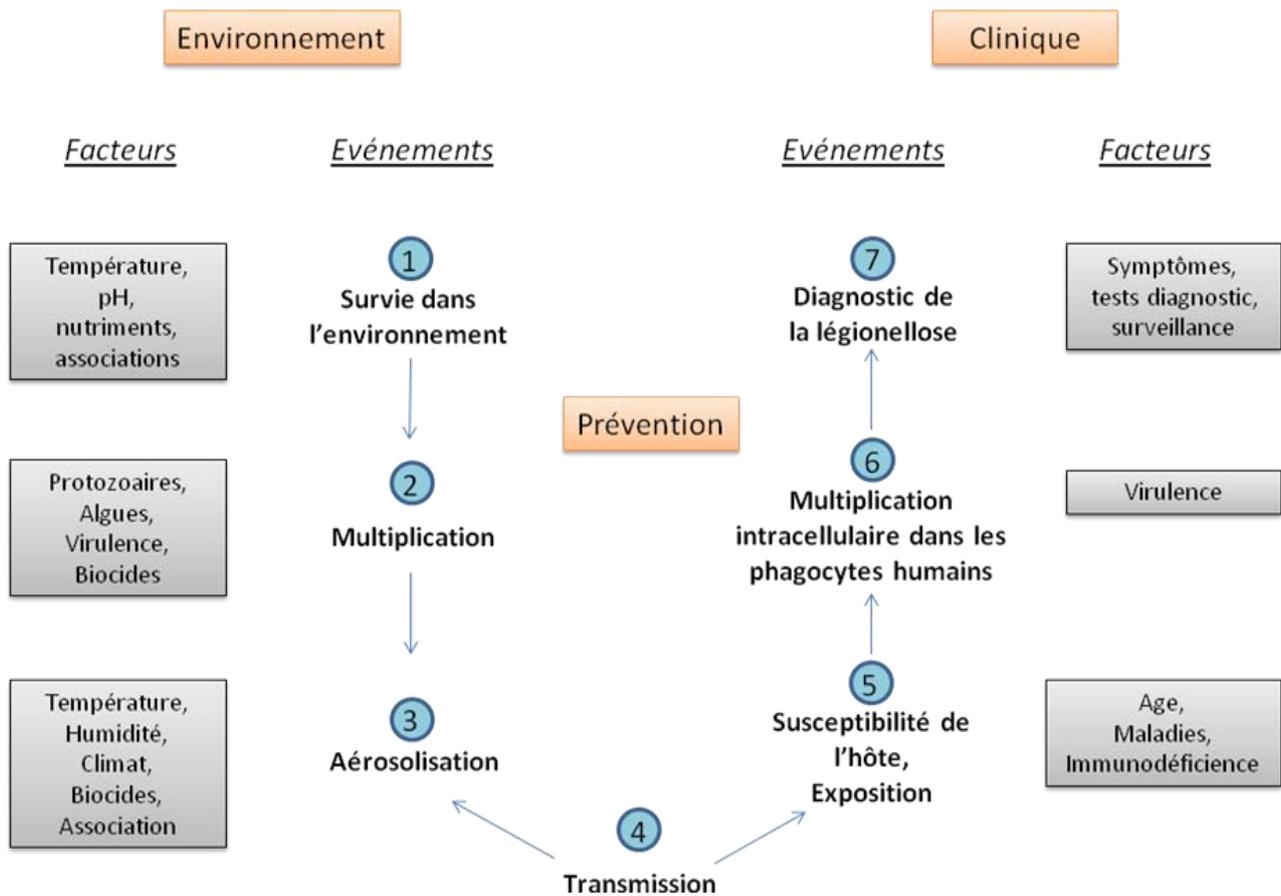


Figure 15 : Schéma des voies de transmission de l'environnement à l'homme de *Legionella*.
(d'après Burges, 1995)

3.2. Les relations dose-effet et dose-réponse

3.2.1. Définition

L'établissement d'une relation dose-réponse ou dose-effet a pour but de quantifier la possibilité d'effet d'un individu en fonction de la dose de micro-organismes à laquelle il a été exposé. Cela passe par l'établissement d'une relation reliant les niveaux de pathogènes consommés, inhalés ou ayant été en contact avec l'individu (= dose) et la probabilité de développement d'infection, sa sévérité ou d'autres effets sanitaires (= réponse ou effet). Tout l'intérêt du modèle est de pouvoir prédire les effets pour de faibles doses, données souvent très parcellaires voire absentes car techniquement impossibles à mesurer.

Selon l'interprétation traditionnelle des informations sur la relation dose-réponse, il existerait un seuil en pathogènes qu'il faudrait ingérer pour que le micro-organisme provoque une infection ou une maladie. On dit qu'il existe un seuil si aucun effet ne se produit en deçà d'un certain niveau

d'exposition, mais si au-dessus de ce niveau, il est certain que l'effet se produit. Cependant à l'heure actuelle, on privilégie davantage une autre hypothèse avançant que, étant donné la capacité de micro-organismes à se multiplier à l'intérieur de l'hôte, une infection peut résulter de la survie d'un seul organisme pathogène infectieux. Cela signifie que, même si la dose est faible, il y a toujours, au moins au sens mathématique, une probabilité d'infection et/ou de maladie. Bien entendu, cette probabilité augmente avec la dose. Ainsi, la probabilité d'infection d'un hôte qui ingère exactement n pathogènes est exprimée par l'équation suivante :

$$P_{inf}(n ; p_m) = 1 - (1 - p_m)^n$$

avec p_m : probabilité que ce pathogène survive à toutes les barrières et colonise l'hôte
 et n : nombre de pathogènes

A partir de cette fonction de base, plusieurs modèles dose-réponse en dérivent dont les plus fréquents sont :

- le modèle exponentiel : on considère qu'un seul micro-organisme peut initier une infection, même si cette probabilité est faible. En découle alors une relation entre la probabilité d'infection P_{inf} d'un individu en fonction de la dose N de germes à laquelle il a été exposé (Armstrong, 2004) :

$$P_{inf} = 1 - e^{-rN}$$

avec r : constante représentant la probabilité qu'une *Legionella* infecte un hôte donné

- le modèle Bêta-poisson : la capacité d'infection de l'hôte par le pathogène est représentée par une distribution de probabilités pour tenir compte du caractère variable de ce paramètre. La formulation mathématique de cette probabilité P_{inf} , suivant une loi Bêta de paramètres α et β s'écrit (Armstrong, 2004) :

$$P_{inf} = 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha}$$

$$\text{ou encore : } P_{inf} = 1 - \left[1 + \frac{N}{N_{50}} \left(2^\alpha - 1\right)\right]^{-\alpha}$$

Ces types de modèles se caractérisent par une extrapolation de type linéaire aux faibles doses, en échelle log.

La modélisation des relations dose-effet doit cependant être considérée comme une description simplifiée d'interactions complexes entre des doses et des effets sanitaires.

Ces modèles présentent néanmoins des limites. En effet, ils sont basés sur des données expérimentales ou épidémiologiques mais les relations dose-réponse dépendent à la fois de l'agent pathogène, de l'hôte et des conditions d'exposition. L'effet dépendra alors du sérotype et de la souche de l'agent pathogène sans compter que la virulence des souches de laboratoire est généralement différente de celle de l'environnement (Bonnard, 2001).

De plus, les populations d'étude sur lesquelles sont basées les relations dose-réponse ne correspondent pas forcément à la population la plus sensible. Les études expérimentales sont généralement faites sur des individus sains (Philip *et al.*, 2006) ou sur des animaux (Berendt *et al.*, 1980) alors que le statut immunitaire et l'âge conditionnent la réponse. Il n'est donc théoriquement pas possible d'appliquer les résultats de l'étude expérimentale à la véritable population de malades (Bonnard, 2001).

Enfin, il n'est pas pris en compte que certains individus puissent développer une immunité totale ou partielle à la maladie par le biais, par exemple, de la prise d'antibiotiques (Coleman et Marks, 1999).

3.2.2. Données disponibles pour *Legionella*

3.2.2.1. Etudes sur l'animal

A l'heure actuelle, aucune relation dose-effet chez l'homme n'a pu être établie. Malgré cela, bon nombre d'études faisant suite à des épidémies permettent de conjecturer l'existence d'une relation entre la dose d'exposition et le risque d'infection d'un individu (Brown *et al.*, 1999 ; Breimer *et al.*, 1990 ; Addiss *et al.*, 1989 ; Fraser *et al.*, 1977). Ainsi, bien que les animaux ne soient pas naturellement infectés par *Legionella*, leur utilisation comme modèle d'étude de la maladie du légionnaire chez l'homme s'est révélée très utile pour comprendre cette pathologie. Ils ont été utilisés pour isoler la bactérie, comme modèle dans l'étude des étapes de l'infection, pour comparer la virulence des différentes espèces de *Legionella*, ainsi que pour tester les techniques de diagnostic

et les approches thérapeutiques. Le cochon d'inde est l'espèce la plus utilisée du fait des similarités observées avec les manifestations de la maladie du légionnaire chez l'homme : fièvre pendant plusieurs jours, bactériémie, pneumonie (Baskerville *et al.*, 1984 ; Davis *et al.*, 1983) ; les signes les plus prononcés étant la fièvre et une perte de poids (Twist-Meijssen *et al.*, 1987). Cependant, d'autres études ont concerné des rats, gerbilles, souris, hamsters, lapins, primates et des œufs de poule embryonnés (Winn *et al.*, 1982 ; Fitzgeorge *et al.* 1983; Patton *et al.*, 1979).

Les voies expérimentales d'exposition employées sont multiples : inhalation (Berendt *et al.*, 1980), instillation nasale (Fitzgeorge *et al.*, 1983 ; Katz *et al.*, 1982), injection intra-trachéale (Winn *et al.*, 1882), ingestion (eau de boisson ou intubation gastrique) et injection intra-péritonéale (Fitzgeorge *et al.*, 1983 ; Hambleton *et al.*, 1982).

Il existe des variations de susceptibilité à l'infection des légionelles selon les espèces animales. Comparés au cochon d'inde, les rats, singes et souris se montrent plus résistants à l'infection de *Legionella* (Winn *et al.*, 1982 ; Davis *et al.*, 1983). Des études réalisées sur les cochons d'inde ont permis de déterminer des doses infectieuses suite à l'exposition des animaux à des aérosols par le biais de chambres d'aérosolisation (Tableau 7).

Tableau 7 : Doses infectieuses répertoriées chez le cochon d'inde à travers plusieurs études.

Dose infectieuse retenue (UFC)	Symptômes	Références
200	100 % d'épisodes fébriles	Breimer et Horwitz, 1987
4-12		Twisk-Meijssen <i>et al.</i> , 1987
$8,0.10^3$		Jepras <i>et al.</i> , 1985
$12,0.10^3$	100 % de fièvre et perte de poids	Davis <i>et al.</i> , 1983
200	100 % d'épisodes fébriles	Fitzgeorge <i>et al.</i> , 1983
$2,6.10^3$		Meenhorst <i>et al.</i> , 1983
50		Muller <i>et al.</i> , 1983
$12,0.10^3$		Davis <i>et al.</i> , 1982
$2,4.10^3$		Baskerville <i>et al.</i> , 1981
129		Berendt <i>et al.</i> , 1980

Comme nous pouvons le remarquer dans le tableau 7, les doses infectieuses sont très variables d'une étude à l'autre : de 4 UFC à $12,0.10^3$ UFC. Ceci peut être en partie expliqué par l'hétérogénéité de la notion d'« infection » pour tous ces auteurs. Celle-ci se caractérise toujours par une perte de poids et un état fébrile mais qui correspond, selon les études, à une augmentation d'1°C (Meenhorst *et al.*, 1983), une température $\geq 40^\circ\text{C}$ (Fitzgeorge *et al.*, 1983) ou encore à deux jours à une température $\geq 40^\circ\text{C}$ (Davis *et al.*, 1982). De plus, ces études n'ont été réalisées que sur *Legionella pneumophila* séro groupe 1, ne permettant pas de confirmer ou infirmer les tendances

épidémiologiques montrant *L. pneumophila* plus virulente que les autres espèces de *Legionella*.

De plus, les études sur les cochons d'inde nous informent sur la dose létale 50 ou DL₅₀ qui correspond à la dose de légionelles entraînant le décès de 50 % des animaux. Les DL₅₀ présentent là encore de grandes disparités entre les études : entre 3,0.10³ UFC et 6,3.10⁵ UFC (Tableau 8). Ces différences sont probablement attribuables à des facteurs non répertoriés par les auteurs et qui influencent pourtant la létalité : le temps d'exposition à *Legionella*, les antécédents et l'âge de l'animal ainsi que le délai d'attente jusqu'au décès.

Tableau 8 : DL50 observées chez des cochons d'inde suite à une exposition à *Legionella*.

Voie d'administration	DL ₅₀ (UFC)	Références
Intra-péritonéale	3,00.10 ⁶	Berendt <i>et al.</i> , 1980
	1,40.10 ⁵	
Inhalation	1,00.10 ⁴	Fitzgeorge <i>et al.</i> , 1983
	5,00.10 ⁴	Dennis et Lee, 1988
	3,00.10 ³	Nowicki <i>et al.</i> , 1988
	1,00.10 ⁴	Mauchline <i>et al.</i> , 1994
	2,00.10 ⁴	
	6,31.10 ⁴	
	6,17.10 ³	James <i>et al.</i> , 1995
	6,31.10 ⁵	

En utilisant deux voies d'administration de l'agent pathogène, Berendt et ses collaborateurs (1980) ont montré que cela influençait la dose létale chez le cochon d'inde. En effet, il existe plus d'un log de différence entre l'injection intra-péritonéale et l'inhalation, cette dernière étant plus létale.

3.2.2.2. Extrapolation des données à l'homme

Les doses infectantes (DI) étant inconnues chez l'homme, le seul moyen d'appréhender son risque de contracter une maladie du légionnaire est d'utiliser les données animales et de les extrapoler. Ces doses infectantes correspondent à la biomasse bactérienne nécessaire pour induire une infection *in situ* au contact de l'interface épithéliale alvéolaire de l'animal exposé. La concentration bactérienne est obtenue par culture à partir des poumons animaux *post mortem*. Dans leur étude, Kliment (1973) et Palm *et al.* (1956) estiment que le taux de rétention pulmonaire des

particules inhalées $\leq 5 \mu\text{m}$ est de 50 %. Cela signifie que la dose d'exposition environnementale à *Legionella* dans les aérosols respirables est environ estimée au double des doses reportées dans la littérature même si cette estimation ne prend pas en compte les pertes de viabilité des bactéries lors de l'aérosolisation (Dennis *et al.*, 1988). On ne recense qu'une étude (Muller *et al.*, 1983) ayant proposé une relation dose-effet à partir de plusieurs concentrations d'exposition à *Legionella*. Ainsi, seule cette étude pourra être retenue pour extrapoler les données de dose infectante et de létalité de l'animal à l'homme.

Concernant la dose létale, Armstrong (2004) considère que parmi les études disponibles (Fitzgeorge *et al.*, 1983 ; Baskerville *et al.*, 1981 ; Berendt *et al.*, 1980), seules les données de Baskerville *et al.* (1981) sont applicables en modèles mathématiques « Exponentiel » et « Bêta-Poisson ». De ce fait, Armstrong a extrapolé ces données du cochon d'inde à l'homme en utilisant le modèle Bêta-Poisson, caractéristique des extrapolations aux faibles doses. Il a ainsi estimé, de manière théorique, que les doses inhalées retenues à risque chez l'homme sont de : $DI_{50} = 11,5 \text{ UFC}$ et $DL_{50} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ UFC}$. En considérant que seuls 50 % des aérosols sont retenus au niveau pulmonaire, il est nécessaire de doubler les niveaux d'exposition réellement à risque présentés ci-dessus soit une $DI_{50} = 23 \text{ UFC}$ pour l'homme.

Ces estimations sont tout de même à considérer avec beaucoup de précautions. Ce ne sont en effet que les premières approches de l'extrapolation d'une relation dose-effet chez l'homme et elles ne sont que purement théoriques. Elles nécessitent bien sûr d'être confirmées puisque la DI_{50} à 23 UFC pour l'homme est inférieure à certaines DI_{50} observées pour les cochons d'inde placés dans des conditions extrêmes d'expérimentation (Tableau 7). De plus, plusieurs paramètres importants ne sont pas pris en compte ici : caractéristiques anatomiques de l'individu, facteurs de risque, survie de l'aérosol avant inhalation, volume réellement inhalé... Enfin, une étude (Mathieu *et al.*, 2006) a pour la première fois mesuré des doses de *Legionella* aéroportées en contexte épidémique : de $3,3 \cdot 10^2$ à $5,4 \cdot 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ air ; ces concentrations sont bien supérieures aux DI_{50} proposées par Armstrong (2004).

Tout ceci met en évidence le manque de données chiffrées relatives aux doses d'exposition à *Legionella* présentant un risque pour l'homme. Des études plus poussées méritent d'être entreprises dans ce sens.

4. Pathogénicité

4.1. Les cellules hôtes

Les particules infectieuses de taille inférieure ou égale à 5 μm parviennent jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Il peut s'agir de légionelles libres, de vésicules amibiennes remplies de légionelles (Berk *et al.*, 1998) ou encore d'amibes infectées (Brieland *et al.*, 1997a ; Brieland *et al.*, 1997b). L'épithélium tapissant l'intérieur des alvéoles pulmonaires est constitué pour 90 % de sa surface de cellules de type 1 qui interviennent dans les échanges gazeux. De plus, elles forment une barrière de protection pour les capillaires sanguins (Figure 16). On note également la présence de macrophages alvéolaires. Ce sont ces deux types de cellules avec lesquelles la bactérie interagit ; elles constituent en quelque sorte la « porte d'entrée » de l'infection et de la dissémination de la maladie chez l'homme. Ces cellules sont une niche de multiplication pour la bactérie (Mody *et al.*, 1993). Brieland et ses collaborateurs (1997a) ont montré que le macrophage alvéolaire permettait une augmentation de l'inoculum bactérien dans le cul-de-sac alvéolaire jusque la 48^{ème} – 72^{ème} heure après l'infection. Lorsque la démultiplication de l'inoculum est effective, *L. pneumophila* entraîne la lyse cellulaire causant d'importantes lésions à la barrière alvéolo-capillaire source de dissémination bactérienne. Ces données expliquent que l'on retrouve *L. pneumophila* dans d'autres territoires pulmonaires ainsi que la décompartmentalisation extrapulmonaire par voie hématogène (Brieland *et al.*, 1994).

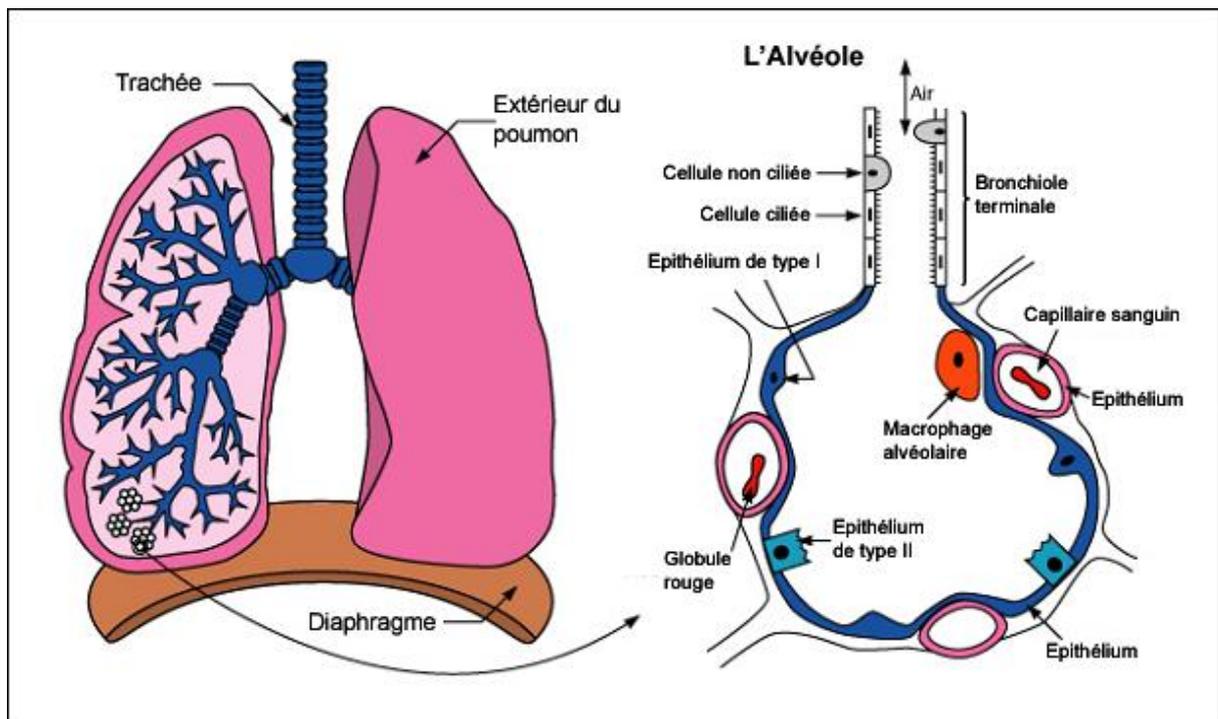


Figure 16 : Schéma simplifié de l'appareil pulmonaire et des bronchioles.
(Thomas, 2004)

4.2. Le cycle de répllication intracellulaire

Les légionelles présentent la particularité d'infecter, par des mécanismes similaires, des cellules humaines mais également certains protozoaires de l'environnement (Gao *et al.*, 1997). Cependant, dans ce paragraphe, nous ne traiterons que de l'infection de cellules humaines. Le mécanisme de pathogénicité fait intervenir les mêmes étapes que lors de l'infection d'amibes (Figure 14) :

- l'adhésion des légionelles aux cellules hôtes et leur pénétration
- la multiplication intracellulaire
- la lyse de la cellule hôte et le relargage des bactéries.

4.2.1. L'adhésion des légionelles aux cellules hôtes et leur pénétration

L'adhésion d'une bactérie intracellulaire facultative telle que *Legionella* à la cellule hôte est une étape indispensable conditionnant l'infection. Nous disposons actuellement d'assez peu de données concernant l'adhésion des légionelles aux cellules hôtes humaines. Il a été montré que l'interaction entre la bactérie et le macrophage serait, au moins en partie, dépendante du complément, faisant intervenir les récepteurs des composants C1 et C3 du complément (Payne et Horwitz, 1987). Ces récepteurs reconnaissent respectivement les fragments C3b et C3bi entraînant ainsi la phagocytose de *Legionella pneumophila* (Krinos *et al.*, 1999). Bellinger-Kawahara et Horwitz (1990) ont montré que la protéine majeure de la membrane externe de *L. pneumophila*, la porine MOMP (*major outer membrane protein*) conduirait à la phagocytose en se liant sélectivement au complément C3, les récepteurs eucaryotes étant encore inconnus à ce jour. Par ailleurs, l'adhésion aux macrophages peut être initiée au moyen d'anticorps spécifiques et du récepteur Fc (reconnaissant le fragment Fc des immunoglobulines) du complément (Husmann et Johnson, 1992).

Les interactions ne dépendant pas du complément feraient appel aux éléments de surface de la bactérie tels que les flagelles, pili (Stone et Abu Kwaik, 1998), lipopolysaccharides (Zahringer *et al.*, 1995), protéines...

Les bactéries pénètrent alors dans la cellule par phagocytose selon deux modes : la phagocytose par enroulement (*coiling phagocytosis*) et la phagocytose conventionnelle (§ I.2.4.1.).

4.2.2. La multiplication intracellulaire

A l'inverse du phénomène d'adhésion, la multiplication intracellulaire des légionelles est très bien documentée (Abu Kwaik *et al.*, 1998 ; Molmeret *et al.*, 2005). Approximativement 4 à 6 heures après l'entrée dans la cellule hôte (macrophage), la vésicule de phagocytose contenant les bactéries est associée à la membrane du réticulum endoplasmique (Swanson et Isberg, 1993). Généralement, la destruction des bactéries par les macrophages fait intervenir un mécanisme de fusion du phagosome et du lysosome. Comme chez l'amibe, cette étape est modifiée, permettant ainsi la multiplication de *Legionella* dans la cellule (§ I.2.4.1.).

4.2.3. La lyse de la cellule hôte et le relargage des bactéries

La dernière étape du cycle d'infection de *Legionella* consiste en la lyse de la cellule hôte et le relargage des bactéries. La mort cellulaire est engendrée par apoptose et/ou par un phénomène de nécrose. Dans les macrophages et cellules épithéliales humaines, *Legionella* induit d'abord une apoptose par l'intermédiaire de l'activation d'une caspase dans les premiers stades d'infection (Gao et Abu Kwaik, 1999) puis suit le phénomène de nécrose causée par la cytotoxicité qu'acquiert la bactérie lorsqu'elle entre en phase post-exponentielle de croissance (Byrne et Swanson, 1998).

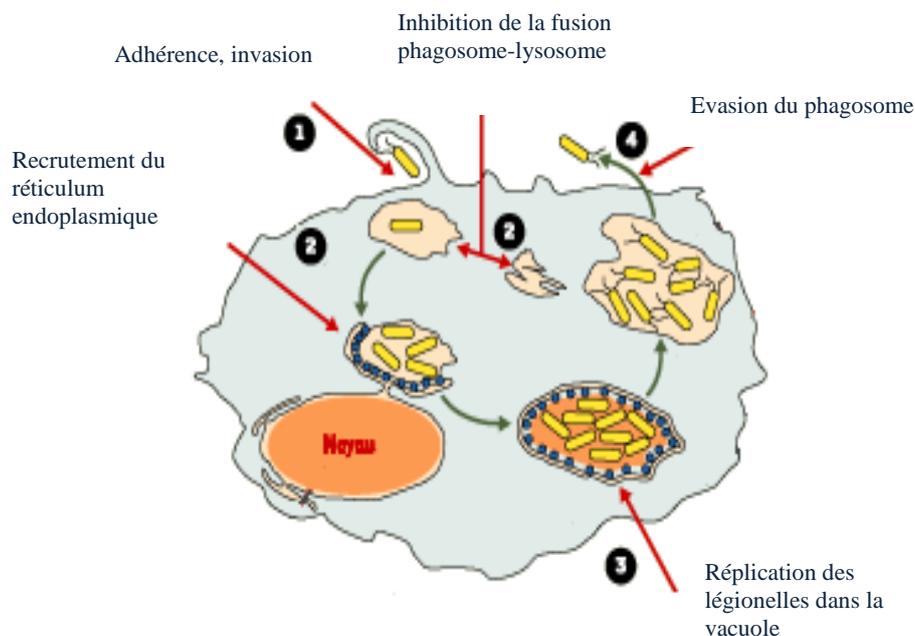


Figure 17 : Cycle intra-cellulaire de *Legionella* dans le macrophage.
(Adapté de Cazalet et Buchrieser, 2005)

Legionella se caractérise par une remarquable plasticité phénotypique où l'on distingue deux états bactériens distincts au cours de son cycle de prolifération intracellulaire. La phase dite répliquative s'effectue au sein du phagosome et permet à la bactérie d'échapper aux mécanismes bactéricides de défense de l'hôte et d'utiliser le métabolisme cellulaire à son profit. La phase dite invasive (ou infectieuse) correspond à un état stationnaire de croissance, hautement transmissif. Les récents travaux *in vitro* ont permis de démontrer la réversibilité d'un état à un autre, appelée «variation de phase» (Molofsky *et al.*, 2004, Cazalet *et al.*, 2004). Ce dimorphisme est associé à une différenciation fonctionnelle dont les principales caractéristiques sont résumées sur la figure 18. Notamment, il a été observé un accroissement de la virulence de la bactérie en fin de cycle de multiplication (Rowbotham, 1986). Byrne et Swanson (1998) ont suggéré que lorsque le niveau de nutriments et les conditions dans la cellule hôte sont favorables, *Legionella pneumophila* connaît une répliquative maximum. A l'inverse, quand les acides aminés deviennent limitants, la bactérie intracellulaire produit des facteurs afin de lyser la cellule hôte, survivre au stress osmotique et se disperser dans l'environnement dans le but de trouver une nouvelle niche intracellulaire pour se répliquer.

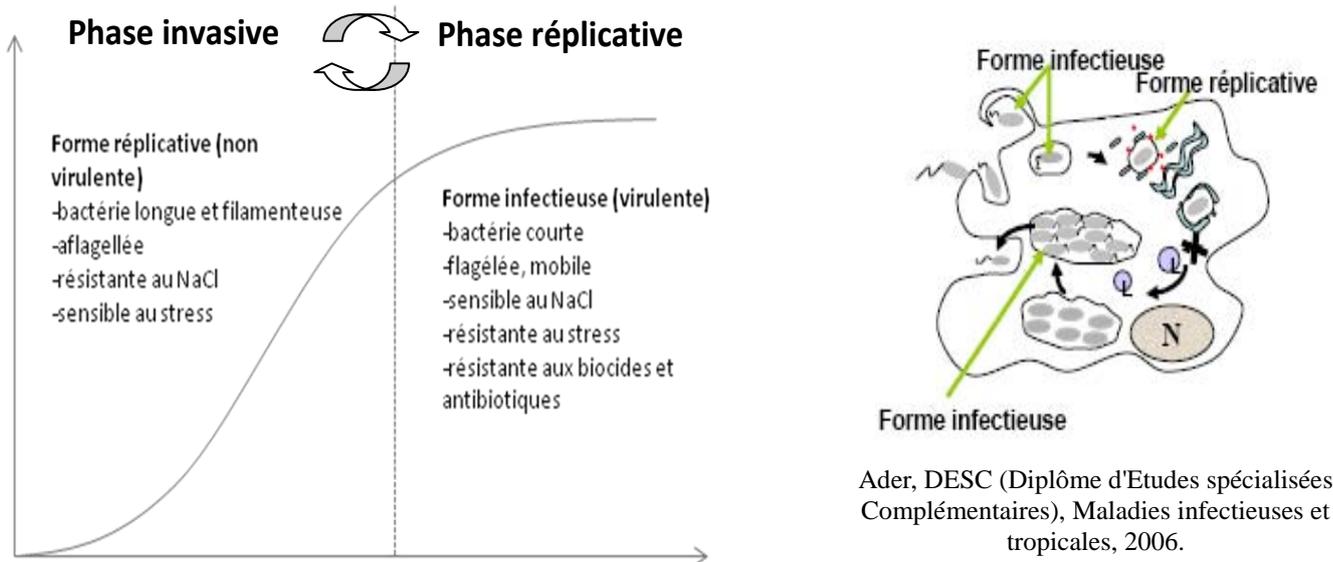


Figure 18 : Transformation phénotypique observée lors de la multiplication intracellulaire de *Legionella pneumophila*.

(Adaptée de Byrne et Swanson, 1998)

4.3. Les différentes formes de légionellose

4.3.1. Maladie du légionnaire

4.3.1.1. Signes cliniques

La maladie du légionnaire est une infection pulmonaire aiguë dont l'incubation dure de 2 à 10 jours. Elle débute ensuite par un état grippal avec fièvre, toux sèche, céphalées, myalgies, anorexie avant qu'apparaisse un tableau plus sévère associant une température élevée, des malaises et douleurs abdominales parfois accompagnés de troubles neurologiques (délire, confusion). La radiographie pulmonaire montre des infiltrats mal limités, hétérogènes, s'étendant progressivement dans les deux champs pulmonaires. Les complications peuvent être un choc, une CIVD (Coagulation IntraVasculaire Disséminée), une insuffisance respiratoire et/ou rénale. Le taux de mortalité est estimé à 15 % mais peut atteindre 80 % chez certains patients selon la sévérité des signes cliniques, le statut immunitaire du patient, la source de l'infection (communautaire ou nosocomiale) et le choix du traitement antibiotique (Jarraud et Freney, 2006). En l'absence de complications, l'évolution des patients atteints de maladie du légionnaire est généralement favorable surtout lors d'une mise en place précoce de l'antibiothérapie ; la rémission apparaît alors entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour.

Dans de rares cas, on peut observer une légionellose extra-pulmonaire chez des patients immunodéprimés (Muder et Yu, 2002). Cette forme clinique, rare mais très grave, correspond à la dissémination de *Legionella* à d'autres territoires (Sire *et al.*, 1994) : atteintes cardiaques (Camara Gonzales *et al.*, 1993), digestives (Leluc *et al.*, 2000), arthritiques (Bemer *et al.*, 2002), rénales (Allen *et al.*, 1985), encéphaliques (Karim *et al.*, 2002), ...

4.3.1.2. Facteurs de risque

Le risque de contracter la maladie du légionnaire pour une personne après avoir été exposée à de l'eau contaminée dépend de certains facteurs : les caractéristiques de l'exposition ainsi que l'état de santé de la personne exposée. Le Conseil Supérieur d'Hygiène Public de France a défini en 2005 deux catégories de populations à risque ((CSHPF), 2005) :

- Les « personnes à haut risque » : les immunodéprimés sévères ou non suite à une transplantation ou greffe d'organe, ou suite à une corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (soit supérieurs à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours).
- Les « personnes à risque » : les individus ayant un système immunitaire fortement diminué du fait d'une pathologie (hémopathie maligne, leucémie, cancers surtout

bronchopulmonaires) ou d'un traitement immunosuppresseur.

D'autres facteurs associés à la maladie sont classiquement incriminés dans la survenue de cette maladie (Marston *et al.*, 1994) :

- L'âge croissant (> 50 ans)
- Le sexe masculin
- Le tabagisme
- L'éthylisme
- L'immunodépression
- Le diabète
- Une affection respiratoire ou cardiaque chronique
- L'insuffisance rénale
- Des antécédents d'intervention chirurgicale récente.

En complément de la susceptibilité des individus, il existe d'autres facteurs favorisant la survenue d'une maladie du légionnaire comme la proximité des installations contaminées, la durée d'exposition aux aérosols contaminés, la concentration bactérienne, l'aérosolisation des bactéries sous forme de particules respirables de taille inférieure à 5 µm et le pouvoir pathogène de la souche (CSHP, 2005).

4.3.2. Fièvre de Pontiac

4.3.2.1. Signes cliniques

Découverte en 1968 lors d'une épidémie ayant eu lieu à Pontiac (Glick *et al.*, 1978), elle n'a pu être reliée à son agent pathogène qu'en 1977. Il s'agit d'une forme bénigne de légionellose qui est analogue à un syndrome pseudo-grippal : fièvre, frissons, céphalées, myalgies (Kaufmann *et al.*, 1981). D'autres symptômes ont également été recensés à travers différents épisodes de fièvre de Pontiac tels que des douleurs abdominales, rougeurs oculaires avec photophobie (Castor *et al.*, 2005), gorge douloureuse, dyspnée (Fields *et al.*, 2001), toux, nausées (Mangione *et al.*, 1985)... Aucune lésion n'est visible en radiographie. La guérison est habituellement spontanée en 2 à 5 jours (Glick *et al.*, 1978).

4.3.2.2. Facteurs de risque

Les données de la littérature concernant les facteurs de risque de la fièvre de Pontiac sont beaucoup plus succinctes que pour la maladie du légionnaire parce que la surveillance de cette pathologie est inexistante. Il semblerait cependant qu'ils soient différents pour ces deux pathologies. En effet, ni l'âge (Freidman *et al.*, 1987 ; Mangione *et al.*, 1985), ni le genre n'ont d'influence sur la survenue de la fièvre de Pontiac (Götz *et al.*, 2001 ; Fenstersheib *et al.*, 1990 ; Friedman *et al.*, 1987).

4.4. Diagnostic de la maladie du légionnaire

4.4.1. Types de prélèvements

Les prélèvements effectués sur les patients en vue de réaliser un diagnostic de maladie du légionnaire sont variés. Ils concernent principalement l'arbre respiratoire (crachats, aspirations trachéales, bronchiques, lavages broncho-alvéolaires, exsudats pleuraux, biopsies pulmonaires) mais ils peuvent également être du sérum ou les urines du patient. Ces prélèvements sont recueillis de manière aseptique et leur envoi au laboratoire doit être effectué dans les plus brefs délais. Si le délai se situe autour de 30 minutes et plus, le prélèvement peut être conservé au réfrigérateur à + 4°C et si ce délai dépasse 24 à 48 h, il doit être congelé à – 20°C au minimum. Enfin, la pratique d'un diagnostic par immunofluorescence directe nécessite que l'échantillon soit formolé au préalable.

4.4.2. Techniques utilisées

4.4.2.1. Recherche d'antigènes solubles urinaires (antigénurie)

La majorité des patients atteints de la maladie du légionnaire possède des antigènes solubles de *Legionella* dans les urines dès l'apparition des symptômes. Ces antigènes sont détectables par méthode immunoenzymatique (ELISA) (Ruf *et al.*, 1990) basée sur un anticorps polyclonal de lapin anti-LPS, radio-immunologique (RIA) (Aguero-Rosenfeld et Eddelsein, 1988) ou par agglutination au latex. Cette technique a transformé le diagnostic de la maladie du légionnaire du fait de son accessibilité à tous et de sa rapidité : son résultat peut être rendu en 15 minutes. Ce test est sensible (80 % sur des urines concentrées) et très spécifique (99 %). Il est positif dès le début de la maladie (2 à 3 jours après l'apparition des signes cliniques), et le reste pendant l'évolution (variable selon les patients : 2 mois en moyenne), même après institution d'un traitement antibiotique actif sur

Legionella. Cependant il ne permet de diagnostiquer que *Legionella pneumophila* séro groupe 1 (la plus souvent en cause), au risque de méconnaître les cas de maladie du légionnaire provoqués par d'autres sérogroupes ou espèces de légionelles.

4.4.2.2. Culture

La culture reste la méthode de référence, permettant d'identifier exactement le type de *Legionella*. Elle nécessite des milieux de culture appropriés et sa demande doit être spécifiée au laboratoire. Elle peut se faire à partir de tout prélèvement respiratoire (le lavage broncho-alvéolaire, les aspirations trachéales ou bronchiques et plus rarement les crachats) (Fields *et al.*, 2002) le meilleur étant le lavage broncho-alvéolaire (LBA). Elle peut être négativée par la prise d'antibiotique efficace sur *Legionella*. Elle a une spécificité de 100 % mais une mauvaise sensibilité, de l'ordre de 60 %. Les résultats sont obtenus après 3 à 10 jours. De ce fait, cette méthode de diagnostic est de plus en plus délaissée en routine ; elle est utilisée aujourd'hui dans moins de 20 % des cas. Cependant, il faut la demander chaque fois que possible, même si l'antigénurie est positive car elle seule permettra une identification précise de la souche (utile voire indispensable en cas d'épidémie et pour identifier une source de contamination).

4.4.2.3. Immunofluorescence directe (IFD)

Cette technique permet une analyse directe à partir du prélèvement clinique (expectorations, aspirations trachéales, lavages bronchiques, biopsies pulmonaires ou liquide pleural). Cette technique met en jeu des anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui reconnaissent tous les sérotypes connus de *L. pneumophila* pour la majorité des réactifs commercialisés. L'examen direct au microscope à fluorescence des prélèvements permet la détection rapide de *Legionella*, soit une heure et demie après l'arrivée du prélèvement pulmonaire (USEPA, 2001). Le principal inconvénient de cette technique est sa faible sensibilité (25 % à 70 %) avec un seuil de détection de 10^4 UFC/mL. La relativement faible spécificité de 65 % est liée à des réactions immunologiques croisées avec certaines autres bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis* et *Francisella tularensis* (Fields *et al.*, 2002 ; Jarraud *et al.*, 2000). Cette technique reste limitée quant au nombre d'espèces testées et reste surtout focalisée sur la recherche de *L. pneumophila* ce qui peut expliquer sa faible utilisation lors de la détermination du diagnostic de la maladie du légionnaire.

4.4.2.4. Sérologie

L'immunofluorescence indirecte (IFI) est une des méthodes les plus employées (Fields *et al.*, 2002), elle est plus sensible que certains tests ELISA (Malan *et al.*, 2003) mais moins spécifique que la culture et l'antigénurie. La séroconversion est confirmée par la multiplication par 4 du taux initial. Les séroconversions se feraient dans les deux premières semaines mais peuvent être tardives (jusqu'à 2 mois). La sérologie ne permet qu'un diagnostic tardif voire rétrospectif et ne présente donc qu'un intérêt essentiellement épidémiologique. Cependant, dans certaines formes très sévères, des séroconversions très précoces ont pu être observées (Rivals, 1997). Enfin, de nombreuses réactions croisées ont été décrites avec les mycobactéries, les leptospires, *Chlamidia*, *Mycoplasma*, *Citrobacter*, *Campylobacter* et *Coxiella brunetii* (Bornstein *et al.*, 1984). Des réactions croisées sont également rencontrées entre les différents sérogroupes et entre les différentes espèces de *Legionella* (Freney *et al.*, 2000).

4.4.2.5. Amplification génique

Pour détecter *Legionella* à l'aide de tests d'amplification génique sont utilisés des prélèvements urinaires, lavages broncho-alvéolaires, et sérums (Jarraud *et al.*, 2000). L'amplification est effectuée sur deux gènes : le gène *mip* (permet de détecter 50 UFC dans les lavages broncho-alvéolaires) (Jaulhac *et al.*, 1992) et le gène *rrf* de petite taille correspondant à l'ARN ribosomal 5S (MacDonell et Cowell, 1987). Les principaux avantages de cette technique sont la rapidité de la détection des *Legionella* et la possibilité de détecter les espèces de *Legionella* autres que *Legionella pneumophila*. Cependant, ce test comporte des limites liées à la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les échantillons biologiques et aux techniques d'extraction d'ADN (Jarraud *et al.*, 2000). Cette technique est encore très peu utilisée en routine pour le diagnostic de la maladie du légionnaire du fait du manque de standardisation dans sa réalisation (Heuner et Swanson, 2008) et parce qu'elle n'est pas incluse dans la définition d'un cas de maladie du légionnaire (BEH n° 30/31, 2008).

Aucune de ces techniques n'est « idéale » pour la réalisation du diagnostic de la maladie du légionnaire, les avantages et inconvénients de chacune sont regroupés dans le Tableau 9. Seule une association de celles-ci permet à la fois de réaliser un diagnostic clinique mais aussi de déterminer l'espèce, le séro groupe et la souche de la bactérie en vue de pouvoir relier le cas diagnostiqué à la source d'origine de la contamination.

Tableau 9 : Tests utilisés dans le diagnostic de la maladie du légionnaire et leurs caractéristiques.

(<http://cnr.univ-lyon1.fr/>; Heuner et Swanson (eds), 2008)

Tests	Délais de résultats	Échantillons	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Inconvénients
Antigénurie	< 1 h	Urines	70-90 %	99,00%	Rapide, précoce, positif même sous traitement Cible l'espèce la plus impliquée dans pathologie	Ne permet la détection que de <i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1, concentration des urines avant analyse est recommandée
Culture	3 à 10 j	Respiratoires	60,00%	100,00%	Détection de toutes les espèces et sérogroupes, intérêt en épidémiologie	Milieux de culture spéciaux, négativation rapide, peu sensible si traitement
IFD	< 4 h	Respiratoires	25,00%	65,00%	Rapide	Réactions croisées
Sérologie	3 à 10 semaines	Sérum	80,00%	97-99 %	Intérêt en épidémiologie	Diagnostic tardif voire rétrospectif car développement de la réponse immunitaire non immédiat
Amplification génique	< 4 h	Respiratoires Sérum Urines	80-100 % 30-50 % 46-86 %	> 90 % > 90 % > 90 %	Détecte toutes les espèces	Technique non encore incluse dans les critères de définition des cas

L'InVS recommande une conduite à tenir pour le diagnostic de la maladie du légionnaire qui est illustrée par le schéma qui suit :

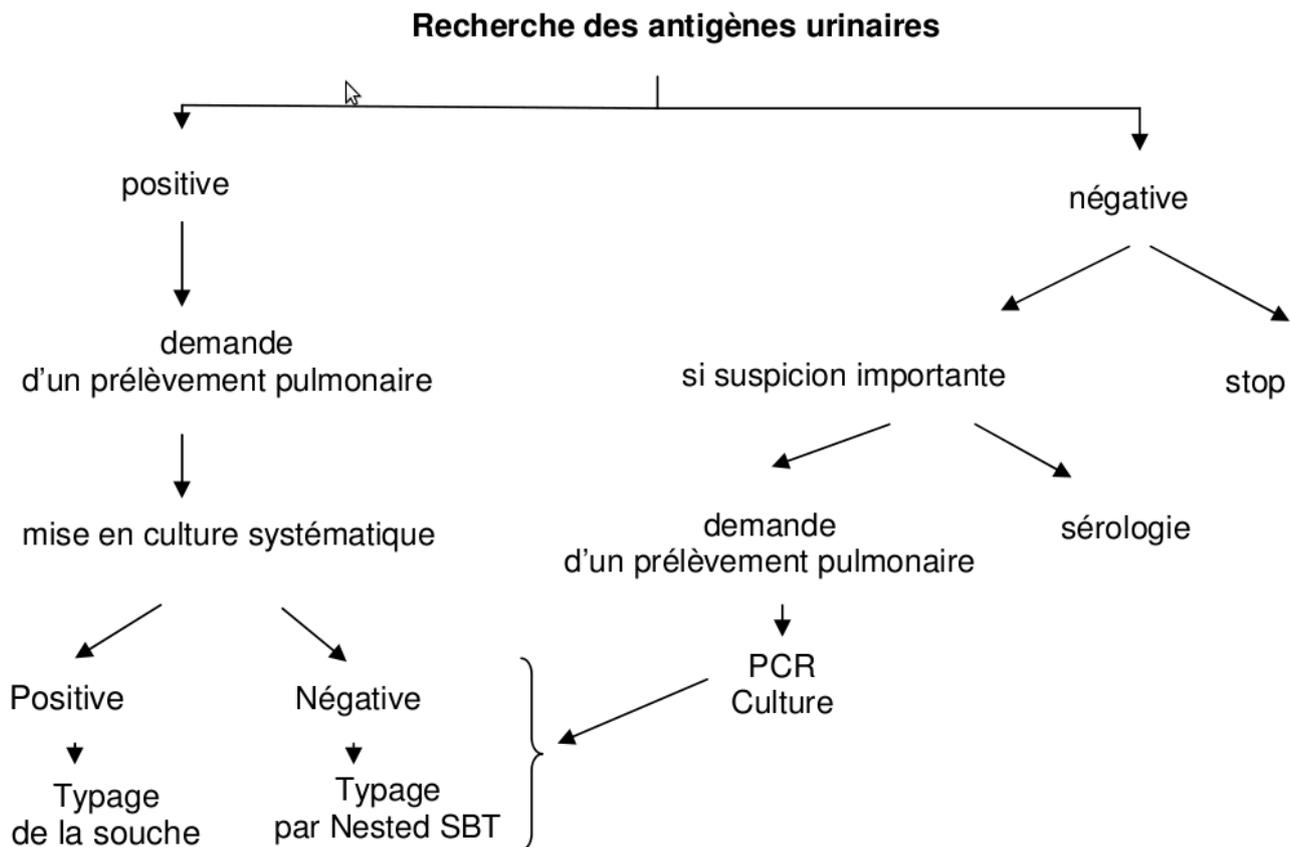


Figure 19 : Schéma de la recommandation de l'InVS concernant la conduite à tenir pour le diagnostic de la maladie du légionnaire.

(Etienne et Jarraud, 2008)

Lors d'une antigénurie positive, la mise en culture de la bactérie doit être systématique. Si la culture aboutit, cela permet le typage de la souche ; technique très utile dans le cadre des enquêtes épidémiologiques pour comparer la souche du patient à celles isolées de l'environnement (§ II.6). Le typage par Nested SBT (Sequence based typing) présente l'avantage de permettre un typage moléculaire malgré une culture négative et ce directement à partir de prélèvements pulmonaires.

4.5. Traitement de la maladie du légionnaire

Devant toute pneumonie grave, le diagnostic différentiel avec les autres agents responsables de pneumonie communautaire ou nosocomiale reste incertain et le choix d'une antibiothérapie probabiliste efficace contre les légionelles est souvent nécessaire. L'érythromycine (antibiotique de la famille des macrolides) constitue le traitement historique de référence depuis l'épidémie de Philadelphie au cours de laquelle la mortalité des patients traités par macrolides fut moindre par

rapport à celle des patients traités par bêtalactamines (Stout *et al.*, 1997). Depuis, des données provenant d'études in vitro, de l'expérimentation animale et certaines données cliniques (Blazquez Garrido *et al.*, 2005 ; Yu *et al.*, 2004) tendraient à montrer une meilleure efficacité des quinolones et en particulier de la lévofloxacine. Seule l'azithromycine et la télichromycine auraient une efficacité en clinique humaine égale aux quinolones (Carbon *et al.*, 2006 ; Plouffe *et al.*, 2003).

Le choix thérapeutique dépend de la sévérité de la maladie et du terrain. L'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) recommande l'utilisation de macrolides ou de fluoroquinolones pour une maladie du légionnaire de gravité légère à modérée. En cas de formes sévères et/ou en présence d'une immunodépression, il est recommandé d'associer deux antibiotiques parmi les trois types de molécules suivantes : macrolides, fluoroquinolones et rifampicine.

Les posologies sont variables selon les molécules employées (Tableau 10). La durée du traitement est de 14 à 21 jours chez les patients immunocompétents et peut être allongée à 30 jours chez les patients immunodéprimés ou dans les formes sévères (Dedicoat *et al.*, 1999).

Tableau 10 : Posologies recommandées par l'Afssaps dans le traitement de la maladie du légionnaire.
(<http://www.afssaps.fr>)

Principes actifs	Posologies quotidiennes
Erythromycine	IV (intraveineuse) : 1 g (3 à 4 fois) PO (per os) : 1 g (3 fois)
Clarithromycine	PO : 500 mg (2 fois)
Dirithromycine	PO : 500 mg en une prise
Josamycine	PO : 1 g (2 fois)
Roxithromycine	PO : 150 mg (2 fois)
Spiramycine	IV : 1,5 M UI (3 fois) PO : 6 à 9 M UI en 2 ou 3 prises
Ciprofloxacine	IV : 400 mg en 2 à 3 fois PO : 500 à 750 mg (2 fois)
Lévofloxacine	IV ou PO : 500 mg ou 1 g (1 fois)
Ofloxacine	IV ou PO : 400 à 800 mg en 2 à 3 prises
Rifampicine	IV ou PO : 20 à 30 mg/kg en 2 prises

Une antibioprophylaxie pour les personnes ayant été exposées à des aérosols contaminés ne se justifie pas au vu des connaissances actuelles. Le CSHPF a rendu un avis le 18 mars 2005 concernant la prévention des maladies du légionnaire nosocomiales. Là encore, l'antibioprophylaxie n'est selon eux pas justifiée. Toutefois, en cas d'épidémie de maladie du légionnaire nosocomiale, en plus des mesures de décontamination du réseau et de protection des patients contre l'exposition, une antibioprophylaxie par un macrolide peut se concevoir chez les sujets à risque.

5. Surveillance des légionelloses et de *Legionella* en France

5.1. Surveillance épidémiologique

La surveillance de la maladie du légionnaire en France est basée depuis 2005 sur plusieurs systèmes complémentaires définis dans le guide d'investigation et d'aide à la gestion (CSHPF, 2005).

5.1.1. Notifications et signalements obligatoires de la maladie du légionnaire

La maladie du légionnaire fait l'objet, en France depuis 1987, d'une surveillance reposant sur la déclaration obligatoire dans le but de suivre l'évolution de l'incidence, de détecter les cas groupés et d'orienter les mesures de prévention. C'est l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) qui, depuis 1996, coordonne et centralise ce réseau au niveau national. Depuis 2003, ce système de déclaration obligatoire (DO) a été actualisé afin de le rendre plus opérationnel et de mieux protéger l'anonymat des patients. Dès lors, la DO consiste en un signalement puis une notification :

- D'après l'article R3113-4 du code de la santé publique, le signalement est effectué par les médecins et les biologistes qui diagnostiquent un cas de maladie du légionnaire. Il doit être transmis sans délai au médecin inspecteur de santé publique de la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS) (Figure 20).
- Le signalement est suivi d'une notification sur une fiche spécifique (précisant la date d'hospitalisation et les expositions à risque) permettant à la DDASS de réaliser une enquête afin d'identifier les expositions à risque, de rechercher d'autres cas liés à ces expositions et de prendre les mesures environnementales appropriées (article R3113-1 à 3 du code de la santé publique).

5.1.2. Signalements obligatoires des infections nosocomiales

Depuis le 26 juillet 2001, un décret contraint les établissements de santé à signaler les cas

d'infections nosocomiales « rares ou particulières » à la fois au Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) et à la DDASS (Figure 20). Il existe une fiche standardisée aidant les médecins notamment lors d'infections suspectées être causées par un germe présent dans l'eau ou dans l'environnement et à l'origine de maladie à déclaration obligatoire.

Ensuite, toutes ces informations permettent au Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CCLIN) d'aider les établissements de santé dans l'investigation des cas et l'élaboration de recommandations, à la demande des établissements eux-mêmes ou à celle de la DDASS.

Enfin, la DDASS a en charge (CSHPF, 2005) :

- de vérifier l'application des mesures de contrôle et coordonne les investigations menées ;
- de vérifier que chaque signalement d'infection nosocomiale a donné lieu à l'envoi d'une fiche de notification obligatoire par l'établissement ;
- de transmettre les fiches validées à l'InVS qui peut apporter un soutien à l'investigation.

5.1.3. Notifications du Centre National de Référence

Le Centre National de Référence des *Legionella* (CNRL) joue à plusieurs niveaux un rôle important dans la surveillance environnementale (Figure 20) :

- Il notifie à l'InVS chaque cas de maladie du légionnaire diagnostiqué au CNRL avant de transmettre l'ensemble des informations recueillies à la DDASS.
- Il a un rôle d'alerte en signalant aux autorités sanitaires les phénomènes anormaux tels que l'apparition de cas groupés.
- Il apporte ses compétences microbiologiques lors d'enquêtes épidémiologiques (épidémiques ou ponctuelles).
- Il met en place une collection bactérienne et une sérothèque nationale dans le but d'identifier l'extension de la transmission bactérienne et l'origine des cas groupés grâce au typage moléculaire systématique de toutes les souches de légionelles.
- Il collabore au réseau international de surveillance des légionelles liées aux voyages (groupe EWGLI : *European Working Group of Legionellosis Infection*) par le biais d'échanges de données concernant le typage moléculaire des souches de légionelles.

Outre son intérêt dans la surveillance environnementale, le CNRL a une activité d'expertise biologique permettant un renforcement du diagnostic des légionelles. Il analyse des sérums et autres prélèvements biologiques adressés par les laboratoires d'analyses médicales privés et publics pour confirmation du diagnostic ou pour un diagnostic de première intention.

5.1.4. Notifications du réseau européen

La France appartient au réseau européen EWGLI (*European working group for legionella infection*), créé en 1987 et regroupant aujourd'hui 36 pays. Ce réseau a pour but de signaler aux autorités sanitaires du pays concerné tout cas de maladie du légionnaire survenu chez une personne ayant voyagé pendant la période d'incubation en précisant les dates et lieux de séjour afin d'identifier les cas groupés. Lorsqu'il s'agit de cas isolés, EWGLI informe et conseille l'établissement en cause. S'il s'agit de cas groupés, une enquête épidémiologique est ouverte. Dans ce cas, si dans un délai de six semaines les autorités ne disposent d'aucune certification quant à une éventuelle prise de mesures, l'établissement en cause est inscrit sur le site internet EWGLI (www.ewgli.org).

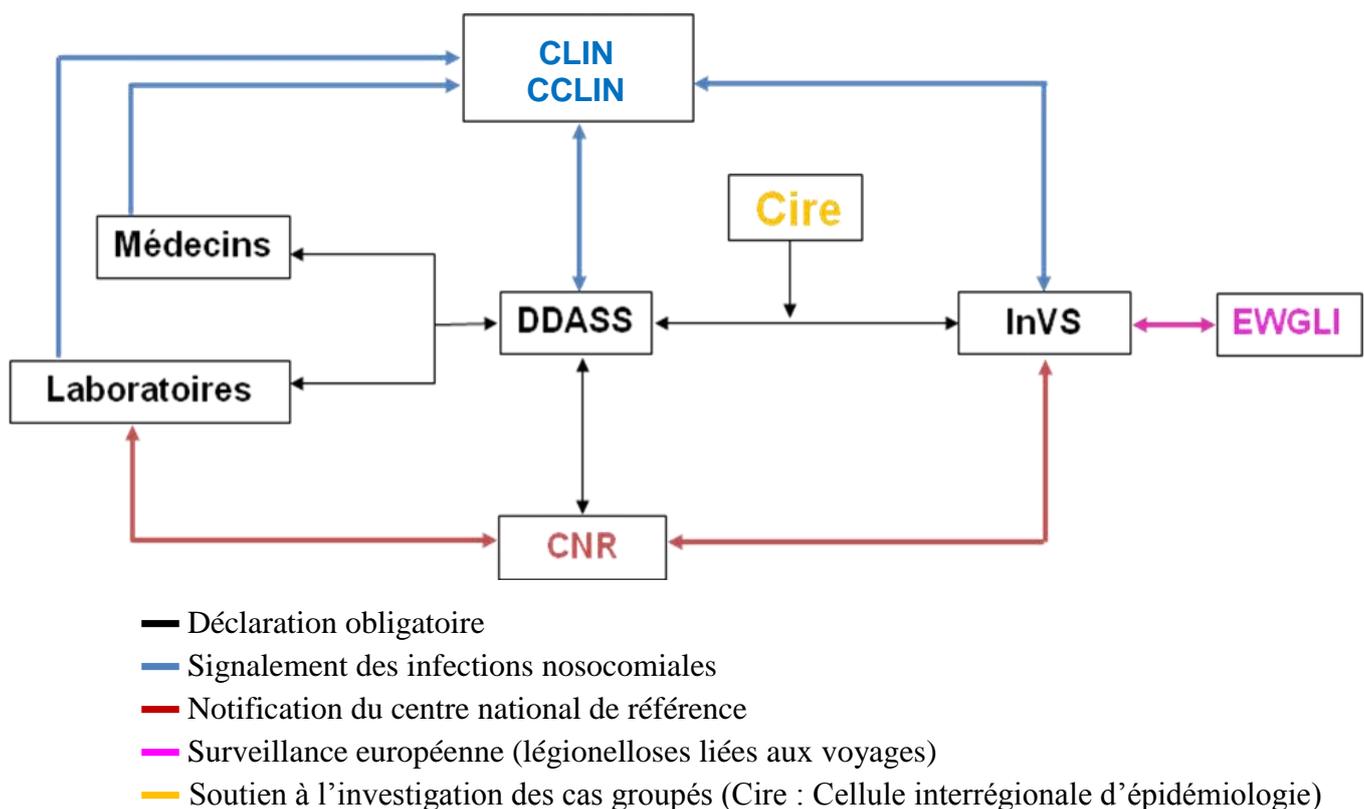


Figure 20 : Organisation de la collecte des données des cas de maladie du légionnaire en France (d'après le CSHPF, 2005)

5.2. Surveillance environnementale

La surveillance environnementale des légionelles consiste en un contrôle de la contamination par *Legionella* dans l'eau des installations à risque (tour aéroréfrigérante, réseau d'eau chaude sanitaire, ...) par la méthode conventionnelle de culture sur gélose. Cette surveillance

repose exclusivement sur le maintien des concentrations en légionelles sous un seuil réglementaire fixé à 10^3 UFC/L d'eau pour les réseaux sanitaires (Tableau 11) (DGS, 2002). Elle sert de base à la démarche de gestion du risque lié aux légionelles qui sera développée dans le paragraphe suivant (§ I.6). Ces niveaux seuils en légionelles ont été fixés de manière empirique en se basant sur des études épidémiologiques, faisant un lien entre absence d'épidémies lorsque la concentration était inférieure à ces valeurs. Puisque la dose infectante n'est pas à ce jour clairement définie, il s'agit de fait de niveaux de gestion des installations et non de niveaux de gestion du risque sanitaire.

Tableau 11 : Mesures mises en place pour la gestion du risque lié à *Legionella spp* ou *Legionella pneumophila* dans l'eau des installations à risque
(CSHPF, 2005 ; DGS, 2002)

	Niveau d'action (UFC/mL)	Mesures de gestion	Références
Réseau d'eau chaude, cas général	$> 10^3$ <i>L. pneumophila</i>	- Niveau d'alerte : renforcer les mesures d'entretien, renforcer les contrôles et le cas échéant vérifier l'origine des écarts par rapport aux résultats d'analyses antérieures.	CSHPF, guide « Gestion du risque lié aux légionelles » publié en 2002.
	$> 10^4$ <i>L. pneumophila</i>	Niveau d'action : mettre en œuvre une intervention technique pour supprimer l'exposition, interdire les usages à risque type douche et mettre en place des moyens curatifs immédiats.	Aucun texte réglementaire ne fixe une concentration maximale admissible de <i>Legionella</i> .
Etablissement de santé	$> 10^3$ <i>L. pneumophila</i>	- Eviter la stagnation et assurer une bonne circulation de l'eau. - Lutter contre l'entartrage et la corrosion. - Maintenir l'eau à une température élevée dans les installations et mitiger l'eau au plus près des points d'usage.	Circulaire du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.
Etablissement thermal	Présence	La gestion dépend de l'étendue de la contamination et de la nature du point contaminé (émergence ou point d'usage). Les mesures de gestion peuvent aller jusqu'à la suspension des soins (du point d'usage contaminé jusqu'à la totalité de l'établissement).	Arrêté et circulaire du 19 juin 2000.
TAR	$> 10^3$ <i>Legionella spp</i>	Mise en œuvre de mesures nécessaires pour atteindre des concentrations $\leq 10^3$ UFC/mL de <i>Legionella spp</i> .	Arrêtés ministériels du 13 décembre 2004.
	$> 10^5$ <i>Legionella spp</i>	- Arrêt de fonctionnement du système de refroidissement. - Information de la DDASS ou du service d'inspection des Installations Classées dans le cas où la tour relève de la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement. - Vidange, nettoyage, désinfection avant remise en service.	Arrêtés ministériels du 13 décembre 2004.

6. Gestion du risque *Legionella*

6.1. Prévention

Le risque de maladie du légionnaire peut être réduit en adoptant les mesures nécessaires pour limiter la prolifération des légionelles dans les installations à risque de dispersion d'aérosols. Depuis 1997 (date du renforcement du système de surveillance) la France s'est dotée de nombreux textes réglementaires à ce sujet. Ils ont à la fois pour but de fixer des seuils de concentrations en légionelles acceptables en terme de gestion des différentes installations à risque (Tableau 11) mais aussi de guider l'ensemble des intervenants impliqués dans la démarche de gestion du risque (conception des réseaux et entretien des installations) (Tableau 12).

Tableau 12 : Principaux textes réglementant la présence de *Legionella* dans les installations à risque.

Etablissements concernés	Textes réglementaires	Contenu	Principales mesures de prévention
Etablissement de santé	Circulaire DGS 97/311 du 24 avril 1997	Relative aux infections nosocomiales.	<ul style="list-style-type: none"> - Lutter contre la stagnation de l'eau en évitant par exemple les bras morts, c'est-à-dire les coudes, où il y aurait une accumulation. - S'assurer de la bonne circulation de l'eau. - Lutter contre l'entartrage et les dépôts via un entretien adapté. - Maintenir la température de l'eau dans les installations à des niveaux élevés.
	Circulaire DGS/VS4 98-771 du 31 décembre 1998 , complétée et remplacée par DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243 du 22 avril 2002	Relative à la prévention des risques liés aux légionelles.	
	Circulaire DGS/SD7A-DHOS/E4-DPPR/SEI n° 2003/306 du 26 juin 2003	Relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les TAR des établissements de santé.	
Etablissement thermal	Circulaire DGS/VS4/2000/336 du 19 juin 2000 et ses annexes	Relative aux règles de maintenance et traitement possible et aide quant à la conduite à tenir en termes de gestion des risques.	<ul style="list-style-type: none"> - Vérifier régulièrement le réseau. - Réaliser des purges des canalisations
TAR	Circulaire DGS/VS4 n°98/771 du 31 décembre 1998	Relative aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans celles des bâtiments recevant du public.	<ul style="list-style-type: none"> - La chloration permanente est souhaitable, dosée à 2 à 3 mg/L de chlore libre. Si ce n'est pas possible pour des problèmes de corrosion, on peut procéder à des chocs chlorés ponctuels. - Une maintenance régulière est conseillée : contrôle de l'intégrité des dispositifs d'arrêt des gouttelettes et remplacement si nécessaire, vérification de la correcte évacuation des eaux de rejet à l'égout, nettoyage périodique des circuits.
	Circulaire MATE (Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement) du 23 avril 1999	Relative au renforcement des prescriptions concernant l'entretien des TAR.	
	Guide de bonnes pratiques : <i>Legionella</i> et tours aérorefrigérante de juin 2001	Aide technique aux personnes concernées et règles de bonnes pratiques.	
	Circulaire DGS n°2002/273 du 2 mai 2002	Relative aux niveaux d'intervention en fonction des concentrations en légionelles dans les TAR.	

Hormis les mesures de prévention concernant ces installations à risque, il existe quelques règles simples, applicables à l'échelle individuelle, pour prévenir la contamination du réseau d'eau alimentant le domicile de chacun (guide pratique, www.poitou-charentes.santé.gouv.fr, 2006) :

- Il faut éviter la stagnation de l'eau. Pour cela, il est important de se servir régulièrement de l'eau chaude. En cas d'inutilisation prolongée, il faut laisser couler l'eau pendant quelques minutes avant de l'utiliser, en sortant de la pièce de préférence.
- Le chauffe-eau doit être réglé à 60°C afin d'éviter la prolifération des légionelles.
- Les éléments de la robinetterie (pommeaux de douche, brise-jets, joints et flexibles) sont à détartrer et à désinfecter tous les 6 mois.
- Les systèmes de climatisation doivent être entretenus par des professionnels et la recherche de légionelles est conseillée chaque année.

6.2. Traitement

Le traitement microbiologique des installations à risque varie selon :

- le type d'eau à traiter : l'eau chaude sanitaire relève d'une réglementation voisine de celle de l'eau potable tandis que les circuits de refroidissement ont moins de contraintes.
- La phase de traitement : le traitement peut être préventif (traitement en général continu) ou curatif dans le cas de nettoyage d'un réseau d'eau contaminé ; le traitement sera alors discontinu et le plus souvent sous forme de chocs.

La prévention du risque lié aux légionelles est exclusivement centrée sur son élimination des environnements hydriques sources. Il existe un nombre important de techniques de désinfection regroupées en trois catégories : les méthodes physiques (ultraviolets et membranes de filtration), les méthodes thermiques (chaleur et pasteurisation) et les méthodes chimiques (agents oxydants, non oxydants et ions métalliques). Chacune d'entre elles présente plus ou moins d'avantages et inconvénients justifiant que certaines soient plus utilisées que d'autres (Tableau 13). C'est le cas du traitement thermique et de la chloration qui sont les deux méthodes les plus largement utilisées à ce jour.

Tableau 13 : Principales méthodes de traitement des circuits d'eau face aux contaminations à *Legionella* ; leurs avantages et inconvénients.
(Simon *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2002)

Méthodes de traitement	Avantages	Inconvénients
Choc thermique	- Pas d'équipements spéciaux (intérêt et cas d'épidémies)	- Procédure longue et difficile à mettre en œuvre (70°C/30 minutes dans tout le réseau), - Risque de brûlure, - Recolonisation bactérienne inéluctable (pas de caractère rémanent).
Ultraviolets	- Facile à installer, - Pas de réactivité avec l'eau et la plomberie.	- Faible turbidité et épaisseur de lame d'eau, - Efficacité insuffisamment démontrée, - Pas d'activité résiduelle, - Coût à l'usage
Hyperchloration	- Activité désinfectante résiduelle efficace à long terme si traitement continu.	- Corrosion et dommages sur la plomberie, - Recolonisation bactérienne inéluctable, - Formation d'organo-chlorés, - Sensible aux pH et à la température.
Dioxyde de chlore	- Activité rémanente importante (1 mg/L en continu), - Moins corrosif que les hypochlorites car utilisé à des concentrations plus faibles, - Ne donne pas de goût à l'eau, - Bon pouvoir pénétrant des biofilms, - Pas de formation d'organo-chlorés.	- Mise en place difficile, - Coûteux, - Générateurs de chlorite et chlorate.
Ozone	- oxydant très efficace, - Pas de corrosion,	- Pas d'effet rémanent, - Formation de sous-produits d'oxydation (aldéhydes, peroxyde d'hydrogène, acide formique, ...) - Process onéreux.
Ionisation par cuivre-argent	- Efficace, - Peu coûteux, - Installation et maintenance acceptables, - Pas d'interférence avec l'eau à haute température, le chlore et les U.V..	- Encrassement des électrodes, - Risque de coloration de l'eau, - Non autorisée en France.

6.2.1. Traitement thermique

Cette technique consiste à monter la température des ballons d'eau chaude à 70°C puis à la distribuer sur l'ensemble des canalisations, robinets et sorties de douches pendant 30 minutes pour permettre l'élimination des légionelles contaminant le site. La réussite de la désinfection impose impérativement que la température de l'eau de tout le réseau soit supérieure à 60°C. En effet, plusieurs études montrent que la désinfection thermique demande au minimum cette température (Rogers *et al.*, 1994 ; Lin *et al.*, 1998).

Cette méthode est recommandée par la circulaire de 1997 (Circulaire DGS 97/311 du 24 avril 1997) et a déjà été utilisée dans plusieurs hôpitaux (Fischer-Hoch *et al.*, 1981). Cependant, il semblerait qu'elle ne soit à l'origine que d'une inhibition partielle des cellules du biofilm et qu'une recolonisation rapide se produise (Farhat *et al.*, 2009). Farhat et ses collaborateurs (2009) ont également observé une « acclimatation » aux températures élevées puisque l'augmentation de température semble moins efficace lors du deuxième cycle de traitement. Dans le même sens, Mouchtouri et ses collègues (2007) montrent que seuls des traitements thermiques répétés et associés à des produits chlorés permettent une élimination complète des légionelles cultivables dans les réseaux d'eau potable étudiés. Malgré cela, beaucoup d'auteurs ont noté une réduction de la dissémination de *Legionella* grâce au maintien d'une température élevée dans les réseaux d'eau (Ribeiro *et al.*, 1987 ; Centers for Disease Control and Prevention, 1997 ; Ezzeddine *et al.*, 1989 ; Colville *et al.*, 1993).

6.2.2. Chloration

La chloration est de loin la méthode la plus utilisée en France et dans le monde. On regroupe sous le nom de chlore libre l'ion hypochlorite (OCl^-) et l'acide hypochloreux (HOCl). Selon le pH, on trouvera plus ou moins d'acide hypochloreux (Figure 21), connu pour être beaucoup plus efficace en désinfection (Kim *et al.*, 2002).

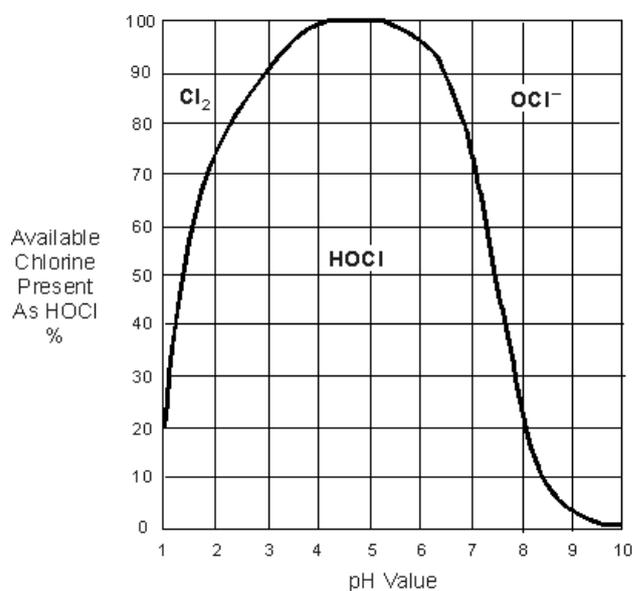


Figure 21 : Courbe de répartition du chlore en fonction du pH.
(www.edstrom.com)

L. pneumophila s'avère être plus résistante au chlore que *E. coli* et d'autres coliformes classiquement utilisés comme indicateurs de qualité d'eau potable (Kuchta *et al.*, 1993). Ainsi, les concentrations nécessaires lors des traitements sont élevées (entre 2 et 6 mg/L contre 1 mg/L habituellement). Il existe trois principaux inconvénients à cette technique :

- l'efficacité à long terme : les légionelles sont en effet rarement éradiquées (Hamilton *et al.*, 1996). De plus, Merlet et ses collègues (2002) ont montré que des traitements répétés de manière séquentielle (alternance de désinfection de quelques heures et de phases de recolonisation de quelques jours) aboutissaient à une deuxième désinfection moins efficace que la première et à une recolonisation plus rapide.

- le pouvoir de corrosion important du chlore parfois accentué par l'adoucissement de l'eau, son chauffage ou les surdosages.

- la toxicité du chlore et des produits issus du procédé de chloration.

En conclusion, il est clair qu'aucun traitement n'est une réponse « miracle » aux problèmes de contamination des réseaux d'eau par *Legionella*. Il semble illusoire d'éradiquer totalement les légionelles car outre les qualités du désinfectant, la réussite d'un traitement repose également sur la qualité du réseau : son âge, son état de corrosion, la présence plus ou moins importante de biofilm bactérien... Ainsi, l'inefficacité relative des traitements de désinfection des installations à risque montre toute l'importance du respect des mesures de prévention en amont.

Par ailleurs, est-il réellement indispensable d'éliminer la totalité des légionelles présentes dans ces réseaux ? Darelid et ses collègues (2002) répondent à cette question par la négative. Ils ont en effet observé que malgré la détection faible mais continue de *L. pneumophila* au niveau des sites de prélèvements d'un centre hospitalier (environ 10 % de cultures positives chaque année), seuls quatre cas de maladie du légionnaire nosocomiale ont été diagnostiqués sur une période de dix ans.

D'autre part, est-il nécessaire de vouloir éradiquer l'ensemble des espèces de légionelles ? Des études ont comparé la fréquence des espèces de *Legionella* trouvées dans l'environnement et dans les prélèvements cliniques (Doléans *et al.*, 2004 ; Harrison *et al.*, 2007). Doléans et ses collègues (2004) remarquent que *L. pneumophila* sg 1 est retrouvée dans 28,2 % de prélèvements environnementaux alors qu'elle est présente chez 95,4 % des patients. A l'inverse, les *Legionella* non *pneumophila* représentent 24,5 % des isolats environnementaux contre 1,2 % seulement des isolats cliniques. Les auteurs en concluent que la prévalence clinique des espèces et sérogroupes de *Legionella* est davantage expliquée par leur différence de pathogénicité plutôt que par leur prévalence environnementale. Harrison *et al.* (2007) font le même constat avec les répartitions

clinique et environnementale de différents sous-groupes de *L. pneumophila* sg 1. Pour exemple, le sous-groupe « Allentown » représente la majorité des prélèvements cliniques (43 %) alors qu'elle n'est détectée que dans 0,7 % des isolats environnementaux. Ainsi, connaître la souche de *Legionella* semble au moins aussi intéressant que de connaître la quantité de celle-ci dans le milieu et cela pourrait permettre d'adapter les éventuelles mesures de traitement.

PARTIE II

Evolution des données épidémiologiques en France de 1987 à 2008

Le travail présenté ci-dessous est le résultat d'une synthèse de données épidémiologiques françaises concernant la maladie du légionnaire. Ces données sont issues des bulletins épidémiologiques publiés par l'Institut de Veille Sanitaire (www.invs.sante.fr) et ce, depuis la mise en place de la déclaration obligatoire pour la maladie du légionnaire (1987) jusqu'en 2008. Ces bulletins rassemblent bon nombre d'informations sur les cas de maladie du légionnaire déclarés en France. Parmi elles on retrouve :

- le nombre de cas et le taux d'incidence de la maladie,
- l'âge moyen des patients,
- le ratio homme/femme,
- la présence éventuelle de facteurs prédisposant à la maladie,
- la létalité,
- les techniques de diagnostic utilisées,
- les souches isolées,
- les sources de contamination avérées ou suspectées.

Le but de cette partie est d'établir un bilan de 20 années de données épidémiologiques concernant l'ensemble des points énumérés ci-dessus et de tenter d'en expliquer les évolutions.

1. Nombre de cas déclarés

1.1. Définition

La définition d'un cas de maladie du légionnaire est standardisée au niveau international. A l'heure actuelle, il est défini de la manière suivante (BEH n°30/31, 2008) :

- Cas confirmé :
 - o isolement de *Legionella* dans un prélèvement bronchique
 - o et/ou augmentation du titre d'anticorps (x 4) avec un deuxième titre minimum de 128
 - o et/ou présence d'antigène soluble urinaire
 - o et/ou immunofluorescence directe.
- Cas probable : titre d'anticorps élevé (≥ 256).

C'est à partir de cette définition que les cas sont répertoriés en France.

1.2. Evolution temporelle des cas déclarés

De 1987, date de mise en place de la déclaration obligatoire pour la maladie du légionnaire, à 1996, le nombre de cas déclarés a stagné (54 cas en moyenne d'après les données de DO). Suite à cela, ce nombre a connu une augmentation importante et régulière depuis 1997 jusqu'en 2005 : on recensait 197 cas en 1997 contre 1527 cas en 2005 (Figure 22). Cela correspond à une croissance annuelle moyenne des cas déclarés de 22 % (BEH n°26, 2006). A l'inverse, nous observons depuis 2005 une baisse progressive du nombre de cas de maladie du légionnaire déclarés (1527 cas en 2005 contre 1244 cas en 2008).

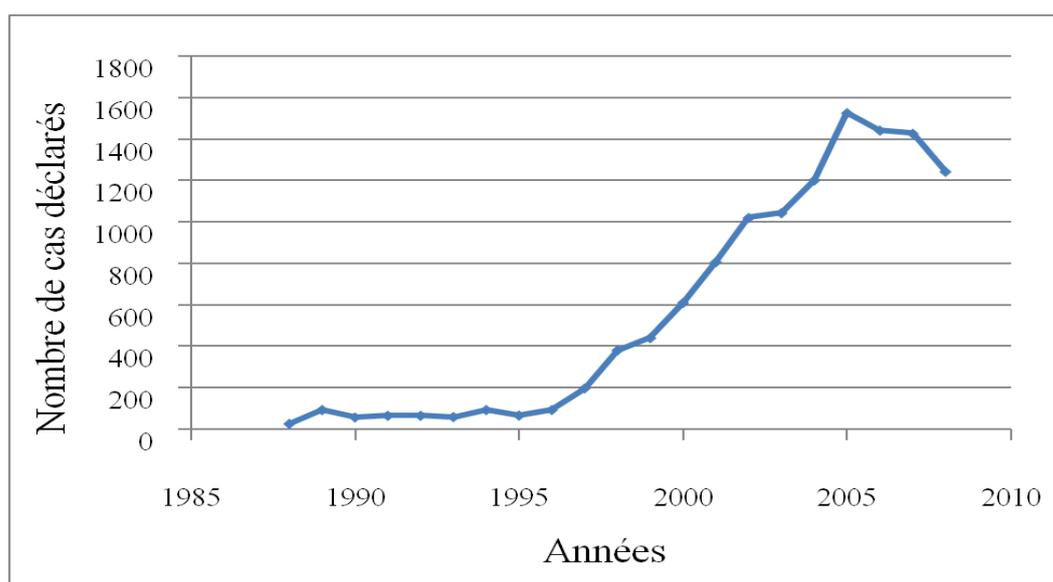


Figure 22 : Courbe représentative du nombre de cas de maladie du légionnaire déclarés en France de 1988 à 2008.

(réalisée à partir des données de la déclaration obligatoire, InVS)

Pour expliquer ce profil du nombre de cas de maladie du légionnaire, de nombreux éléments entrent en compte ; nous les détaillerons successivement dans les paragraphes suivants.

1.2.1. Augmentation du nombre de cas de maladie du légionnaire entre 1997 et 2005

La principale explication réside dans le renforcement du système de surveillance à partir de 1997 grâce à la mise en place d'un système interactif de signalement des cas de maladie du légionnaire entre le Centre National de Référence des Légionelles et l'InVS. Cela fait suite à une étude réalisée par le Réseau National de Santé Publique (RNSP) et le CNRL avec la collaboration

des laboratoires hospitaliers (DGS n° 97/311, 1997). Celle-ci a permis d'estimer à environ 530 le nombre total de cas de maladie du légionnaire diagnostiqués en France en 1995 alors qu'une cinquantaine seulement avait été déclarée. Cette étude a alors montré, à cette époque, les lacunes de la déclaration obligatoire pour la maladie du légionnaire:

- la sous-déclaration était majeure (90 % des cas n'étaient pas déclarés), ne permettant pas d'obtenir des informations fiables sur la situation épidémiologique ni d'identifier correctement les cas groupés.
- la définition de cas utilisée pour la surveillance nécessitait une actualisation afin de mieux prendre en compte les nouvelles méthodes diagnostiques. En effet, le développement de l'antigénurie a donné lieu à une modification de la définition d'un cas. Dès 1997 (commission de l'OMS), un test à l'antigène urinaire positif est synonyme d'un cas certain de maladie du légionnaire (alors qu'il n'était que présomptif jusqu'alors).

Pour tenter de corriger cette sous-estimation des cas de maladie du légionnaire, une nouvelle fiche de déclaration de cas a été mise en place (cf Annexe). Elle intègre donc une nouvelle définition de cas (i.e celle donnée au § II.1.2) et doit être adressée dans les meilleurs délais en priorité aux pneumologues, réanimateurs et services de médecine interne ainsi qu'aux médecins assurant le suivi de patients en cure thermale. Malgré la nette amélioration du recensement des cas de maladie du légionnaire depuis 1997, il convient de poursuivre les efforts entrepris puisqu'il reste encore à ce jour des cas non déclarés. En effet, comme il est précisé dans le « Plan Régional Santé Environnement des Pays de la Loire », une sous-estimation des cas est reconnue et évaluée à environ 30 % de cas non déclarés (Plan gouvernemental de prévention de la maladie du légionnaire, 2004).

Le second élément en faveur d'une augmentation du nombre de cas de la pathologie concerne l'amélioration des pratiques de diagnostic. Le graphique ci-dessous indique la répartition des méthodes de diagnostic ayant permis de détecter les cas survenus en France entre 1997 et 2008 (Figure 23). Il apparaît clairement que la détection d'antigènes urinaires prend le dessus sur les autres méthodes à peine deux ans après son apparition en 1997. L'augmentation du nombre de cas de maladie du légionnaire à partir de cette année est donc probablement liée à une meilleure détection de ceux-ci grâce à cette technique. Elle permet en effet un diagnostic rapide (2 à 3 jours suivant l'apparition des signes cliniques chez 90 % des patients), spécifique (99 %) et sensible (80 %).

Une étude rétrospective a été réalisée sur 15 ans (1986-2001) au CHU d'Amiens (François-Devos *et al.*, 2003). Les auteurs ont comparé la fréquence de la maladie du légionnaire avant et

après la mise en place de la détection de l'antigène urinaire de *L. pneumophila* sg 1 au CHU en 1999. Les résultats indiquent que la mise à disposition de l'antigène urinaire aurait quasiment multiplié par quatre la fréquence du diagnostic de la maladie du légionnaire. En effet, 17 cas ont été diagnostiqués sur 13 ans (1999-2001) contre 15 cas sur 3 ans (1999-2001), et ce, en l'absence d'épidémie sur la période étudiée (1999-2001). Il est à noter que ce test est spécifique de *L. pneumophila* sg 1. Ainsi, l'incidence est potentiellement sous-estimée même si *L. pneumophila* sg 1 est responsable de plus de 80 % des cas de maladie du légionnaire (Jarraud *et al.*, 2007). Cette étude confirme bien l'importance de ce test dans l'augmentation des cas ces dernières années.

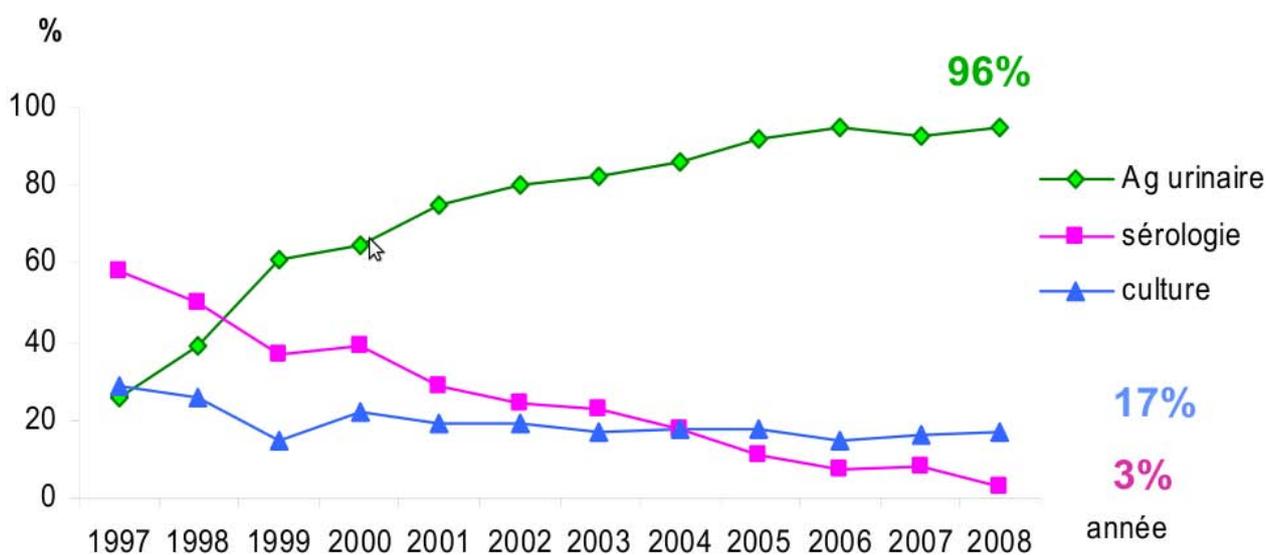


Figure 23 : Répartition annuelle des méthodes de diagnostic des cas de maladie du légionnaire survenus en France de 1997 à 2008.
(www.invs.sante.fr)

Une autre explication à l'augmentation du nombre de cas durant ces dix dernières années repose sur l'amélioration de l'interaction des différents partenaires de la veille sanitaire. Une étude réalisée par l'InVS a permis d'évaluer la réactivité des signalements à la DDASS de 1998 à 2006 (Figure 24). Celle-ci révèle une diminution flagrante et constante du délai médian entre la date de début des symptômes et la date de signalement. Tandis que ce délai s'élevait à près de 30 jours en moyenne en 1998, il était inférieur à une dizaine de jours en 2006. D'autre part, en 1998, la proportion de cas signalés à la DDASS dans un délai d'une période d'incubation (10 jours) était minoritaire par rapport aux cas signalés dans un délai de deux périodes d'incubation. En 2006, la tendance s'est largement inversée (près de 3/4 des cas sont signalés dans un délai d'une période d'incubation (10 jours)), témoignant à nouveau d'une plus grande réactivité des professionnels de santé.

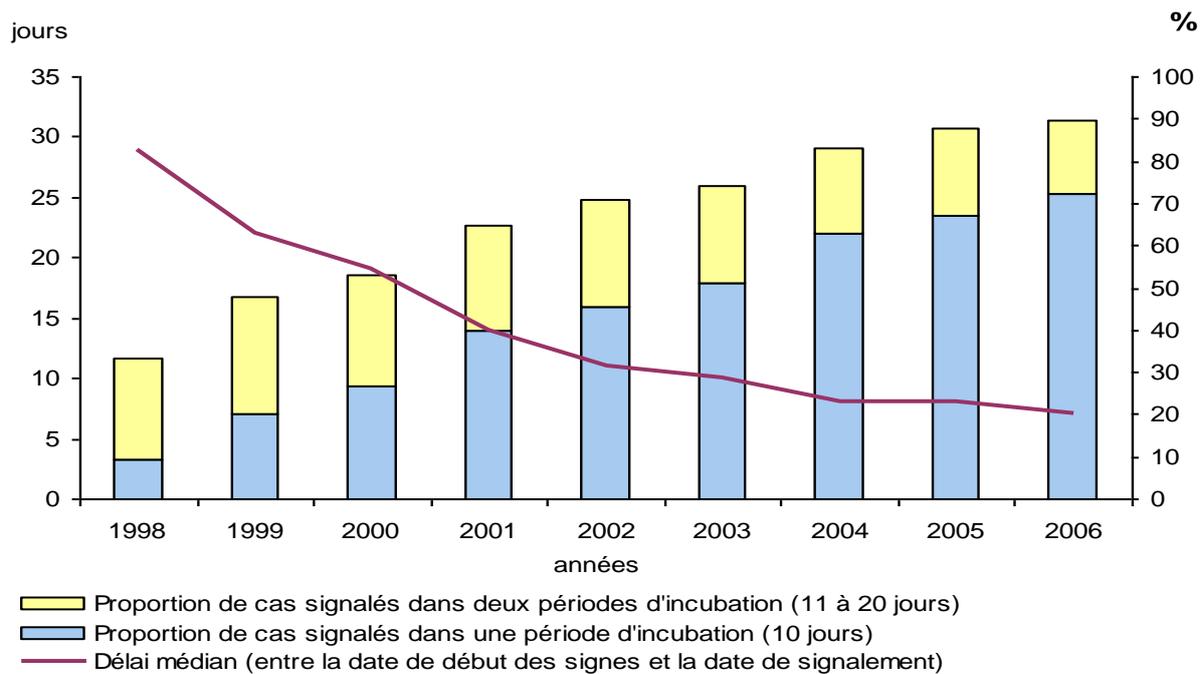


Figure 24 : Évaluation de la réactivité des signalements à la DDASS entre 1998 et 2006.
(www.invs.sante.fr)

En parallèle de tous ces éléments, il est possible que la médiatisation des épidémies ait aidé à accroître la sensibilisation des professionnels de santé. En France, hormis pour des épidémies nosocomiales, la maladie du légionnaire fit assez peu parler d'elle jusqu'à la fin des années 90. La surveillance était alors trop médiocre (environ 50 cas déclarés par an) pour détecter des cas groupés. C'est depuis 1997, date du renforcement de la surveillance et de la sensibilisation des cliniciens, que les épidémies ont été détectées et médiatisées. Cela a commencé par l'épidémie de juillet 1998 qui a alors lieu en pleine Coupe du monde de football. Vingt cas sont déclarés dont 4 mortels (BEH n°12, 2000). Par la suite, l'actualité sera régulièrement ponctuée d'incidents de ce type, la plus importante épidémie ayant touché le Pas-de-Calais en 2003/2004 : 86 cas avérés de maladie du légionnaire dont 18 décès (BEH n°36-37, 2004).

Ainsi, la médiatisation des épidémies survenues en France ou à l'étranger ces dernières années a pu contribuer à sensibiliser les médecins à la fois au diagnostic de la maladie mais également à l'intérêt de la déclaration.

De multiples facteurs ont contribué à une déclaration plus exhaustive du nombre de cas de maladie du légionnaire depuis 1997. Cependant, ne peut-on pas envisager une augmentation réelle du nombre de cas ? Chaque progrès technique a sa contrepartie. En effet, la multitude de réseaux d'eau ainsi que l'essor des systèmes de climatisation ont favorisé le développement des légionelles (humidité et chaleur) et donc la potentielle augmentation d'un risque sanitaire lié à cet agent pathogène. D'autres installations de plus en plus répandues aujourd'hui telles que les jacuzzis, humidificateurs et même certaines fontaines décoratives peuvent également héberger des légionelles (Zuravleff *et al.*, 1983 ; Mahoney *et al.*, 1992, Correia *et al.*, 2001 ; Heng *et al.*, 1997 ; Hlady *et al.*, 1993). Aussi, la multiplication de ces différents aménagements, couplée à un mauvais entretien de ceux-ci, a probablement eu un impact sur l'augmentation du nombre de cas de maladie du légionnaire observée jusqu'en 2005. Dans ce sens, des efforts ont depuis été faits pour améliorer l'entretien des installations et ainsi réduire le risque lié aux légionelles (cf § I.5.2.).

Nous pourrions également envisager que soient apparues, au fil des années, des souches/génotypes de *Legionella* plus virulentes contribuant de ce fait à une augmentation du nombre de cas. Cette hypothèse est difficile à vérifier car la part de patients pour lesquels l'isolement de la souche est réalisé reste très faible, de l'ordre de 20 %. Le CNRL, organisme qui identifie les isolats, a cependant observé des évolutions quant au type des principales souches retrouvées chez les patients entre 1995 et 2008. Cela sera détaillé par la suite dans le paragraphe 6. Néanmoins ces évolutions ne semblent pas suivre celle du nombre de cas de maladie du légionnaire.

Pour conclure, bien qu'il soit difficile d'évaluer la part d'une réelle augmentation du nombre de maladies du légionnaire dans cette évolution des cas déclarés du fait de la multitude de facteurs entrant en compte, nous retiendrons que l'amélioration de la surveillance, des techniques de diagnostic des cas et de la collaboration entre acteurs responsables de la surveillance a conduit à une meilleure description épidémiologique de cette maladie en France.

1.2.2. Diminution du nombre de cas de maladie du légionnaire entre 2005 et 2008

Depuis 2005, la diminution du nombre de cas déclarés semble se confirmer : en 2008, on note une diminution de près de 20 % par rapport à 2005 (Tableau 14). Ceci est sans doute lié au fait qu'aucune épidémie de grande ampleur telle que celle de Lens (2003/2004) n'est à déplorer sur cette période, à l'amélioration du système de surveillance et à la sensibilisation de tous les acteurs techniques, médicaux, institutionnels.... évoquée précédemment. Notons également que les analyses systématiques et les investigations effectuées par les autorités locales sur la base du guide d'investigation et d'aide à la gestion (DGS, 2005) ont permis de mieux documenter les expositions à

risque et de mettre en place de manière précoce des mesures de prévention et de contrôle des sources possibles de contamination.

Cependant, l'objectif ambitieux du Plan National Santé Environnement de 2009, mis en place par les autorités gouvernementales en 2004 est loin d'être atteint. Il visait à réduire l'incidence de la maladie du légionnaire de 50 % alors que la baisse observée n'a été que de 20 %. Il importe alors d'intensifier les contrôles des installations à risques et d'accroître encore la sensibilisation des gestionnaires à la maîtrise du risque.

Tableau 14 : Nombre de cas de maladie du légionnaire déclarés de 2005 à 2008.
(données de la DO, InVS)

Années	Nombre de cas de maladie du légionnaire déclarés
2005	1527
2006	1443
2007	1428
2008	1244

2. Age moyen des patients

La maladie du légionnaire peut atteindre des individus de tout âge mais l'incidence selon la classe d'âge est très variable. L'histogramme présenté ci-dessous nous indique l'incidence par sexe et classe d'âge des cas de maladie du légionnaire survenus en France entre 1998 et 2008 (Figure 25). On en retient deux informations principales. D'une part, l'incidence de la pathologie chez les hommes est bien supérieure à celle des femmes (élément développé dans le paragraphe suivant : § II.3). D'autre part, quel que soit le sexe de l'individu, il apparaît que l'incidence augmente avec l'âge de celui-ci : les patients de plus de 80 ans sont 10 fois plus nombreux que les trentenaires. Un âge avancé est effectivement l'un des facteurs décrits dans la littérature comme prédisposant à la maladie du légionnaire (Marston *et al.*, 1994). Les patients de moins de 30 ans sont très minoritaires (incidence de près de 0,2 pour 100 000 individus) et concernent souvent des enfants, voire nourrissons, présentant un déficit immunitaire pathologique (BEH 30-31, 2008 ; BEH 30-31, 2002 ; BEH 42, 2001).

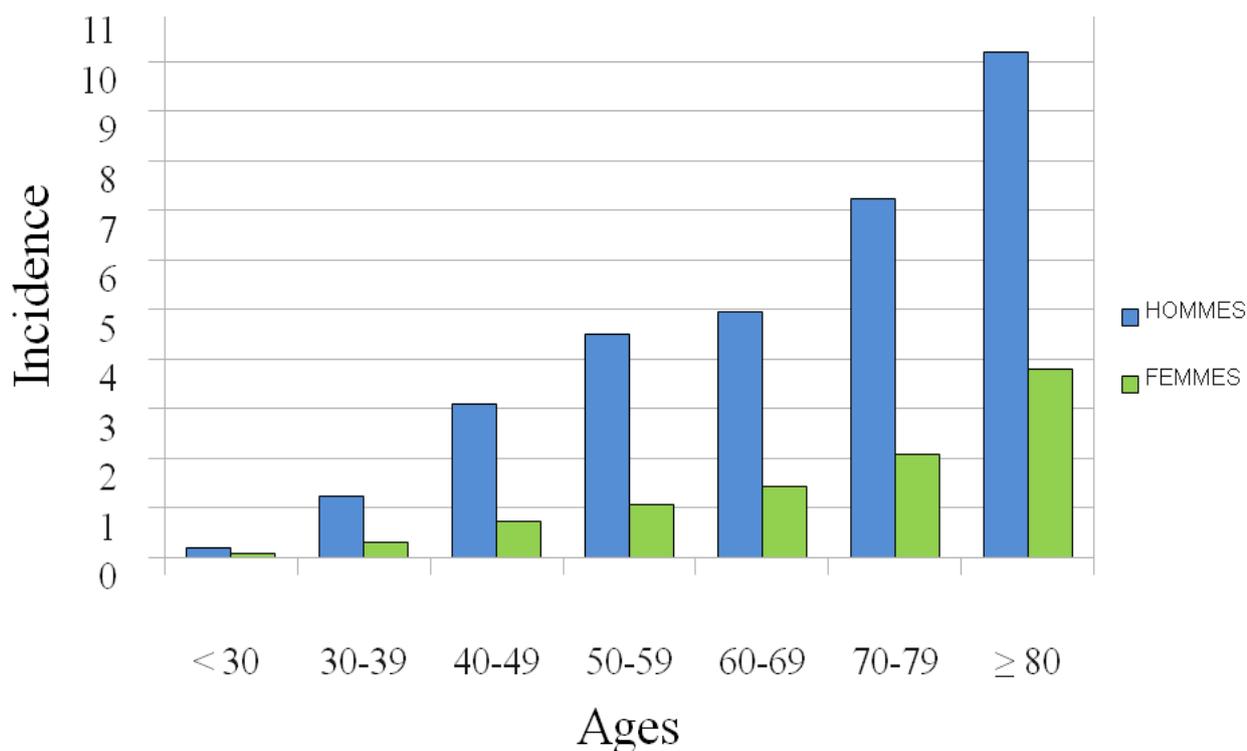


Figure 25 : Représentation de l'incidence (nombre de sujets atteints pour 100 000 individus) par sexe et classe d'âge des cas de maladie du légionnaire survenus en France entre 1998 et 2008.
(graphique réalisé d'après les données de la DO collectées sur le site de l'InVS)

Nous avons certes remarqué que les patients âgés étaient les plus représentés parmi les patients atteints de la maladie du légionnaire mais qu'en est-il de l'évolution de l'âge moyen des individus depuis 1987 à nos jours ?

Est représenté ci-dessous le graphique permettant de visualiser l'évolution des âges moyens des patients atteints de la maladie du légionnaire entre 1987 et 2008. La progression, bien que faible, semble constante : l'âge moyen était de 56 ans en 1987 contre 61 ans en 2008 (Figure 26). Ainsi, l'augmentation moyenne est de 5 ans sur cette période.

Cette lente progression de la moyenne d'âge des patients paraissant constante, nous pouvons certainement écarter l'influence d'un meilleur recensement survenu après 1997. En revanche, cela pourrait concorder avec l'augmentation de l'espérance de vie à la naissance puisqu'entre 1987 et 2008, celle-ci a augmenté de 4,7 ans en moyenne (4 ans chez les femmes et 5,4 ans chez les hommes) (Tableau 15).

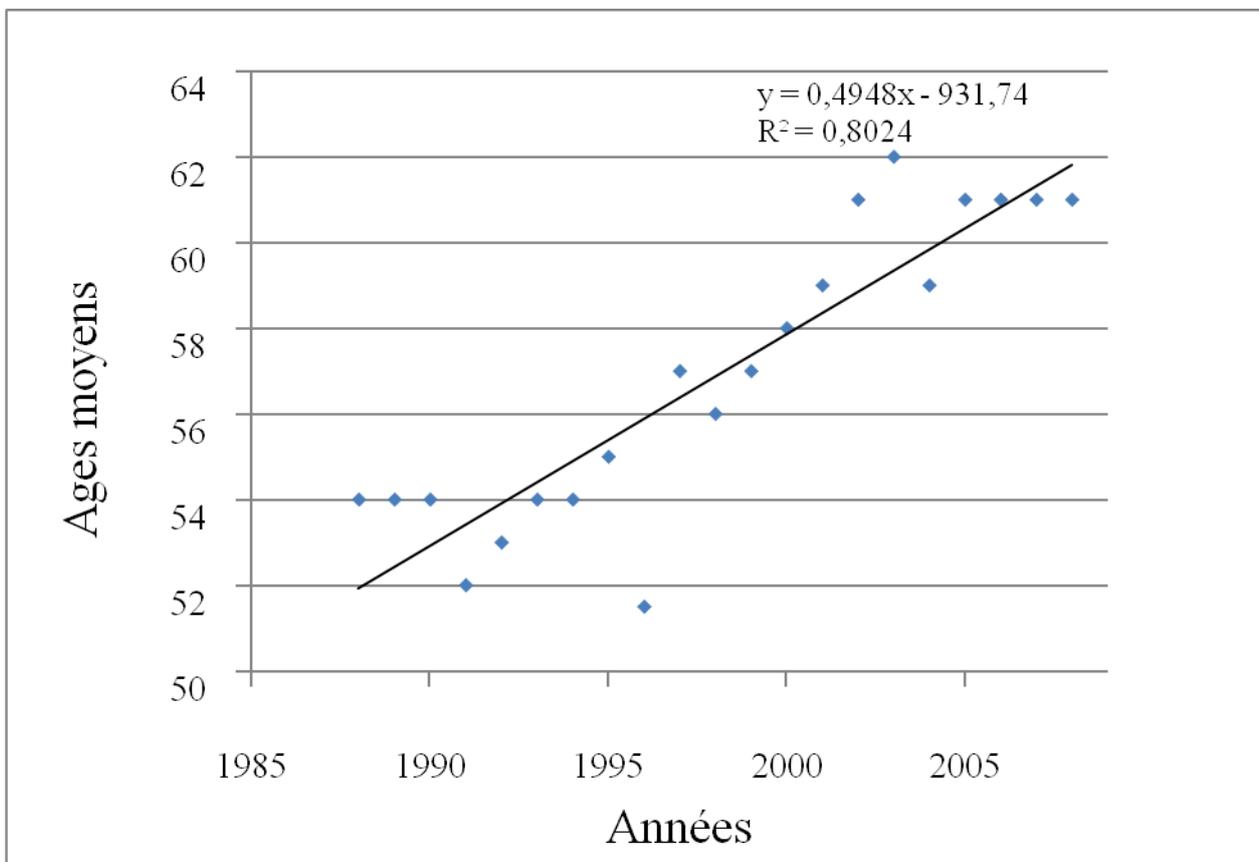


Figure 26 : Représentation graphique de l'évolution de l'âge moyen des patients atteints de la maladie du légionnaire entre 1987 et 2008.

(graphique réalisé d'après les données de la déclaration obligatoire collectées sur le site de l'InVS)

Tableau 15 : Espérance de vie à la naissance des hommes et des femmes en 1987 et en 2008.

(Eco-Santé France 2008, d'après données INSEE)

	1987	2008	Progression de l'espérance de vie
Hommes	72,1	77,5	5,4
Femmes	80,3	84,3	4

3. Sexe ratio

Le ratio homme/femme (proportion d'hommes atteints par rapport à celle des femmes) de la maladie du légionnaire en France depuis 1987 est très variable d'une année à l'autre (par exemple : ratio de 2,2 en 1991 et de 3,8 en 1992). Cependant, quelle que soit l'année, les hommes sont plus atteints par cette pathologie que les femmes avec en moyenne 3 hommes atteints pour 1 femme seulement (Figure 25, Tableau 16).

Tableau 16 : Proportion Homme/Femme parmi les patients atteints de la maladie du légionnaire de 1987 à 2008.

(données issues de la DO collectées sur le site de l'InVS)

Années	Sexe ratio homme/ femme	Années	Sexe ratio homme/ femme
1987	3	1998	3,1
1988	3	1999	2,8
1989	3	2000	3,1
1990	2,8	2001	3,1
1991	2,2	2002	2,9
1992	3,8	2003	2,6
1993	2,8	2004	2,5
1994	2,8	2005	3
1995	2,4	2006	2,8
1996	4	2007	3,2
1997	4,2	2008	3
		Moyenne	3

Pourquoi une telle différence homme/femme ? Une explication peut être trouvée dans les facteurs prédisposants pour tenter d'expliquer ce sexe ratio de 3 hommes pour une femme pour la maladie du légionnaire. On remarque qu'en 2007, un ou plusieurs facteurs favorisant ont été retrouvés chez 70 % des patients. De nombreux facteurs ont été répertoriés (§ I.4.3.1.2.) mais certains sont associés plus fréquemment que les autres à la maladie (Figure 27). En effet, le tabagisme est retrouvé dans plus de 40 % des cas, suivi des pathologies cardiaques, respiratoires et de l'éthylisme (catégorie « autres » de la figure 27) qui sont présents dans 20 % des cas en moyenne. Les autres facteurs avoisinent en moyenne les 10 %.

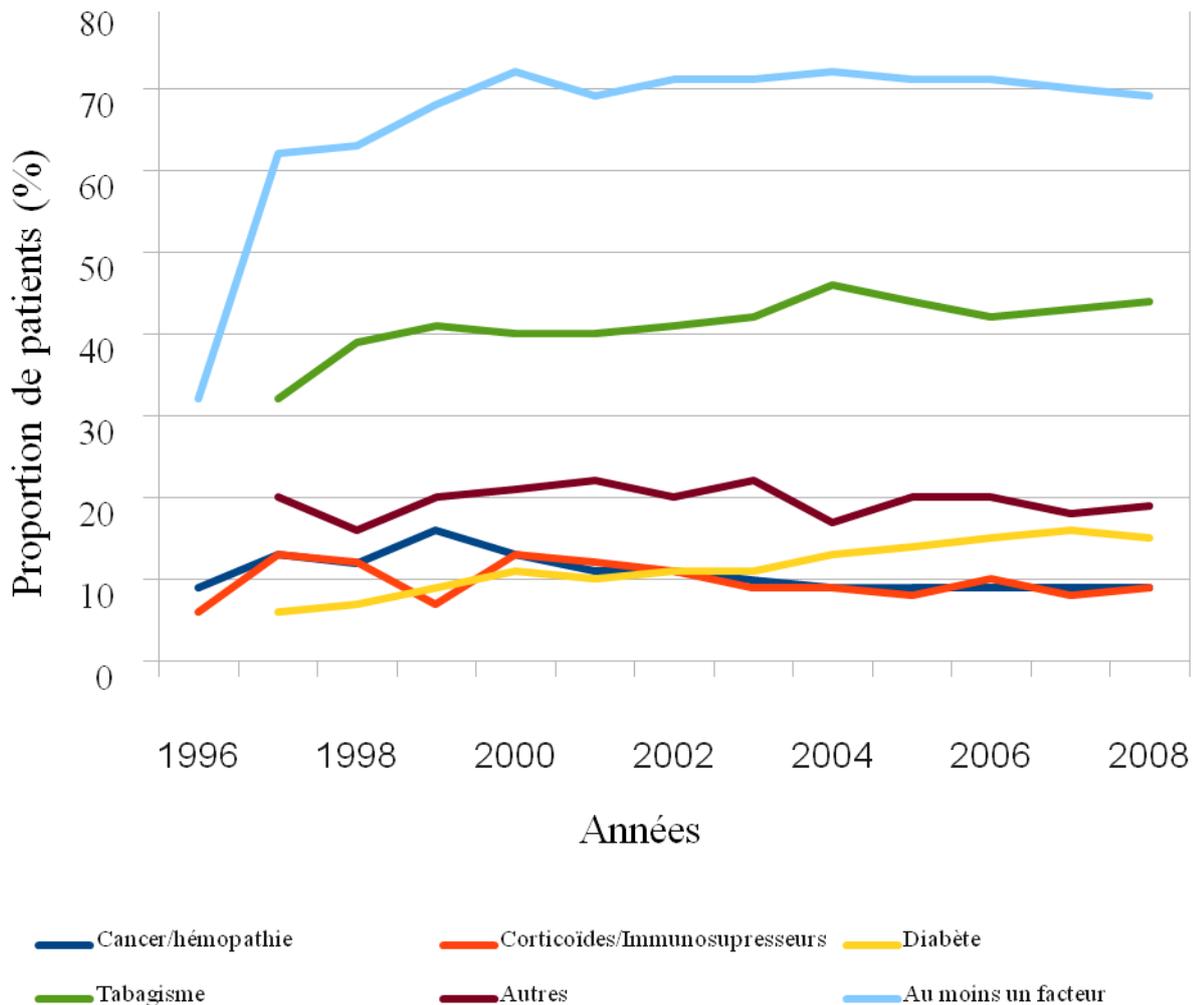


Figure 27 : Représentation graphique de l'évolution, sur la période 1996 - 2008, de la proportion des patients chez lesquels ont été retrouvés les différents facteurs prédisposants.
(graphique réalisé à partir de données de la DO collectées sur le site de l'InVS)

Intéressons nous dans un premier temps au tabagisme. Le graphique (Figure 28) présenté ci-dessous indique l'évolution de la proportion de fumeurs chez les hommes et les femmes, des années 1950 à 2000. L'élément important à retenir est que la proportion de fumeurs est bien supérieure à celle des fumeuses. Même si l'écart tend à se réduire aujourd'hui entre les hommes et les femmes, les hommes âgés de plus de 80 ans (correspondant à la population la plus touchée) en 2008 ont un passé tabagique bien plus important que celui des femmes. De ce fait, davantage d'hommes ont fumé ou fument toujours, ceci pouvant expliquer, au moins en partie, leur plus grande susceptibilité à la maladie du légionnaire.

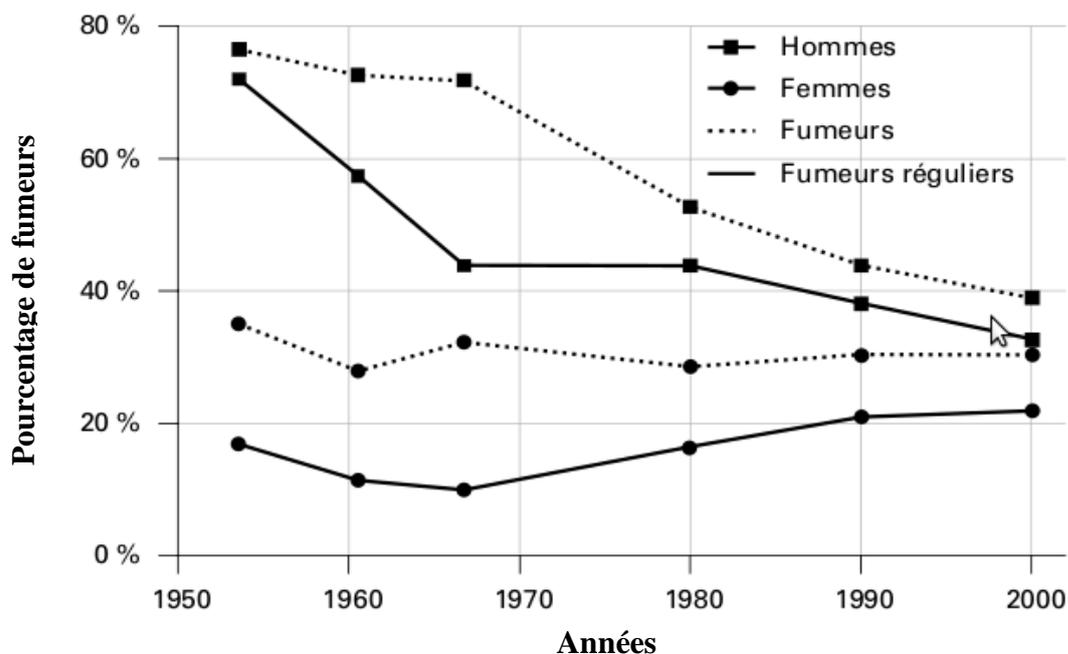


Figure 28 : Évolution des proportions de fumeurs et de fumeurs réguliers en France de 1950 à 2000.
(BEH n° 22/23, 2003)

Par ailleurs, le tabac est incriminé dans bon nombre de pathologies respiratoires puisque les poumons et les bronches sont les premiers organes à être affectés par la fumée de tabac. Or, les pathologies respiratoires appartiennent également aux pathologies prédisposant à la maladie du légionnaire. Parmi celles-ci, on retrouve la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) souvent associée à un tabagisme de plusieurs décades, pour laquelle le sexe ratio est à nouveau en faveur des hommes avec 5 hommes atteints pour 1 femme seulement (Taytard, 2007). Concernant les pathologies cardiaques, une étude de Cheval *et al.* (2007) montre que parmi les urgences cardiovasculaires qu'ils ont répertoriées, le syndrome coronarien aigu concerne 2 hommes pour 1 femme mais le sexe ratio est de 1 pour les autres pathologies (insuffisance cardiaque, trouble du rythme, maladie thrombo-embolique).

Enfin de nos jours, près de 6,4 millions de français consomment de l'alcool tous les jours. On compte néanmoins, en 2006, environ trois fois plus d'hommes consommateurs que de femmes (Canarelli *et al.*, 2006). De plus, même si cette tendance est modifiée suivant l'âge celle-ci reste en faveur des hommes : 56 % des hommes et 23 % des femmes entre 65 et 75 ans ; 5 % des hommes et moins de 1 % des femmes entre 20 et 25 ans. Là encore, les hommes possèdent donc plus

fréquemment le facteur de risque « éthylisme » que les femmes.

En conclusion, il s'avère que les hommes sont statistiquement plus susceptibles de posséder les principaux facteurs aggravants pouvant peut-être expliquer en partie le sexe ratio de 3 de la maladie du légionnaire.

4. Létalité

Le graphique ci dessous (Figure 29) a été réalisé, sur la base des données disponibles dans les bulletins épidémiologiques parus chaque année, à partir de 1997, date à laquelle les données sont devenues plus exhaustives du fait du renforcement du système de surveillance. L'évolution de la létalité s'est principalement faite en deux phases :

- une progression de 20 % à 25 % entre 1997 et 2000 en parallèle de l'augmentation du nombre de cas déclarés.
- une diminution de 25 % à environ 10 % entre 2000 et 2008.

Il est très difficile de relier l'évolution de la létalité à celle du nombre de cas de maladie du légionnaire déclarés du fait des nombreux facteurs influençant l'un et l'autre des paramètres. Cependant, ce qu'il est intéressant de retenir ici est qu'à partir de 2000, la létalité connaît une baisse importante, et ce malgré l'augmentation constante du nombre de cas de la maladie. Ceci est probablement révélateur d'une meilleure prise en charge de cette pathologie. La mise en place d'un diagnostic plus précoce (utilisation plus systématique de l'antigénurie en cas de pneumonie sévère) a probablement permis l'identification de cas potentiellement moins graves (car découverts plus tôt). De plus, cette précocité du diagnostic conduit à l'instauration plus rapide d'une antibiothérapie adaptée (Bulletin de l'OFSP, 2008).

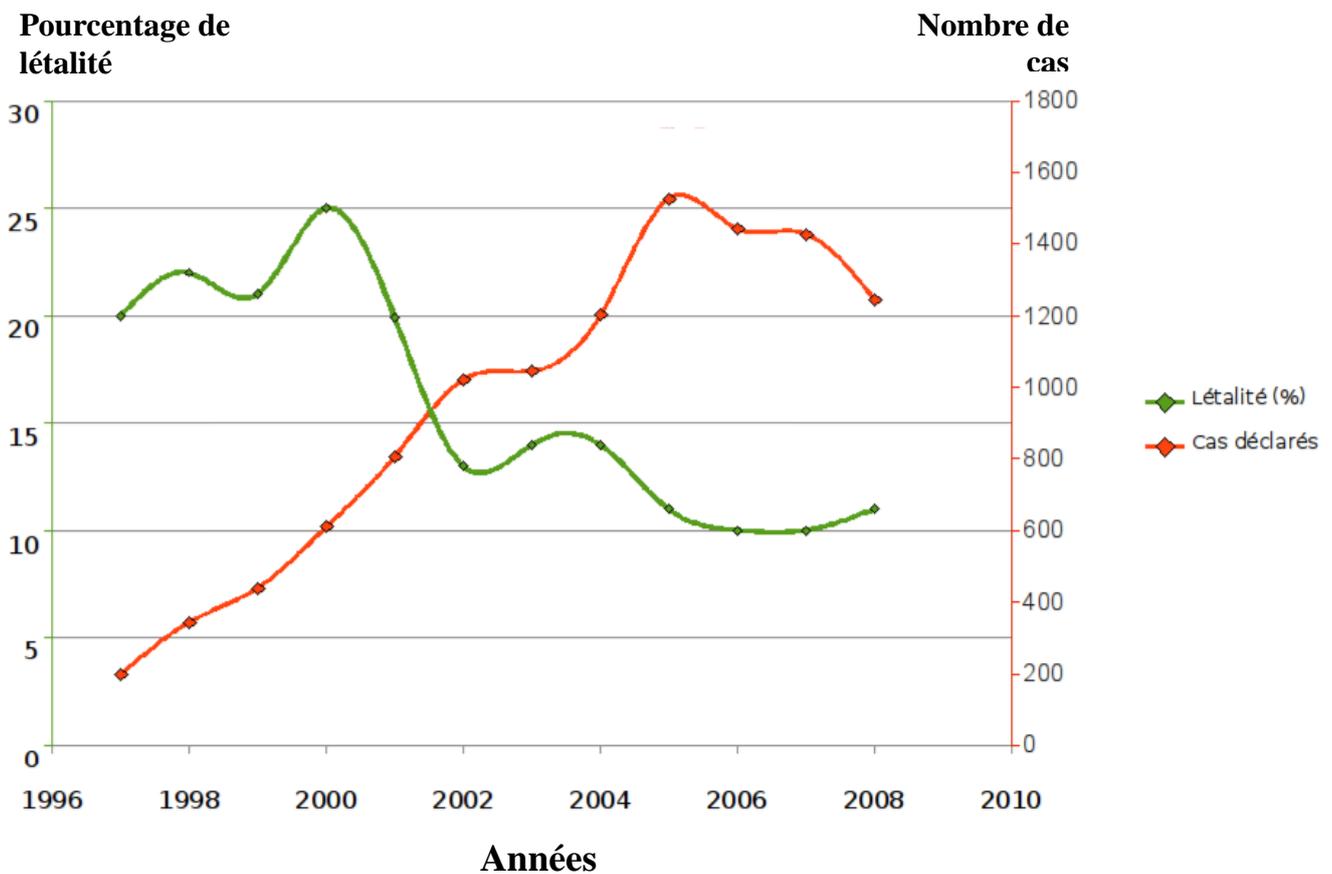


Figure 29 : Représentation de l'évolution de la létalité de la maladie du légionnaire en parallèle du nombre de cas déclarés entre 1997 et 2008.
 (graphique réalisé d'après les données de la DO, collectées sur le site de l'InVS)

5. Caractéristiques phénotypiques des souches

Depuis 1997, la connaissance de l'espèce et du sérotype de la bactérie infectant le patient s'est nettement améliorée. Alors que ces caractéristiques étaient connues pour 84 % des patients en 1997, elles l'étaient pour 99 % des cas en 2006. (Tableau 17).

Tableau 17 : Proportion des patients pour lesquels l'espèce et le sérotype de *Legionella* ont pu être identifiés de 1997 à 2006.

Années	Pourcentage de patients pour lesquels espèces et sérotypes sont renseignés (%)	Références
1997	84	BEH n°6, 1999
1998	82,7	BEH n°12, 2000
1999	92	BEH n°52, 2000
2000	80	BEH n°42, 2001
2001	Non renseigné	
2002	96	BEH n°32, 2003
2003	95	BEH n°36/37, 2004
2004	97	BEH n°26, 2005
2005	99	BEH n°26, 2006
2006	99	BEH n°43, 2007
Moyenne	91,63	

Une espèce de *Legionella* est largement majoritaire : *Legionella pneumophila*. Détectée chez 90 % des patients en 1997, elle est présente chez 99 % des cas depuis 2002. Parmi les divers sérotypes que contient cette espèce, le sérotype 1 est de plus en plus fréquemment retrouvé depuis 1997, passant de 79 à 95 % de présence chez les patients (Figure 30). Plus qu'une réelle augmentation de ce sérotype parmi les sujets atteints par la pathologie, cela traduit probablement une meilleure détection du sérotype 1 depuis la mise en place de la recherche des antigènes urinaires en 1997 (ce test étant spécifique des *L. pneumophila* sg1).

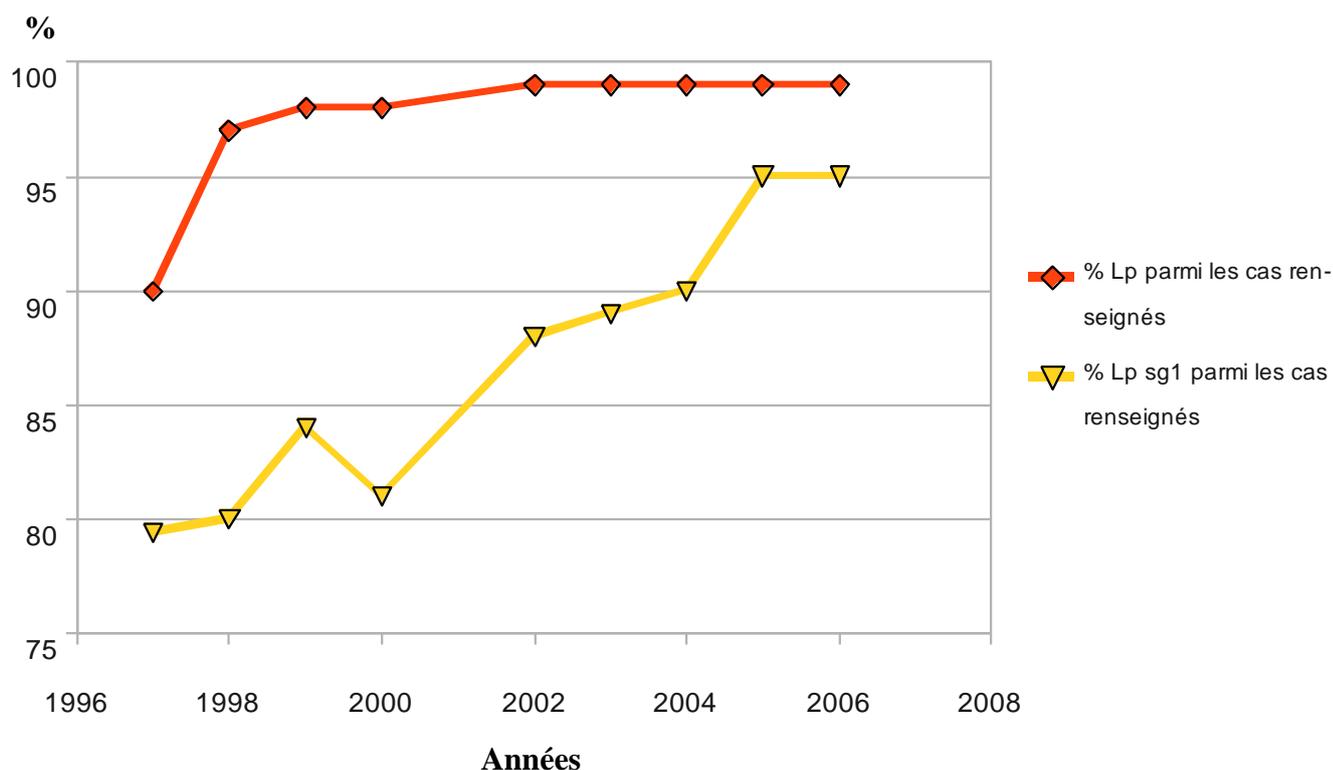


Figure 30 : Évolution du pourcentage de *Legionella pneumophila* (Lp) et de *Legionella pneumophila* sg 1 (Lp sg1) parmi les cas de maladie du légionnaire pour lesquels l'espèce et le sérotype de la bactérie sont connus.

(graphique réalisé d'après les données issues des bulletins épidémiologiques de 1997 à 2006)

Ainsi, du fait de l'absence de tests cliniques spécifiques des autres *Legionella*, le seul moyen de connaître l'espèce et le sérotype de la bactérie chez les patients qui ne sont pas infectés par *L. pneumophila* sg 1 est la mise en culture de prélèvements cliniques. Le problème qui se pose est la très faible proportion de patients pour lesquels est réalisée cette opération : l'isolement n'est effectué ou n'aboutit que dans 20 % des cas en moyenne sachant que cette tendance a très peu évolué depuis 2000 (Figure 31). Néanmoins, parmi les 20 % de souches isolées, nous retrouvons la très forte prépondérance de *L. pneumophila* sg 1 qui représente plus de 90 % des isolements (Figure 31). Les 10 % restants sont partagés entre les autres sérotypes de *Legionella pneumophila* et une dizaine de *Legionella non pneumophila* (Tableau 18). Loin derrière le sérotype 1, les *Legionella pneumophila* de sérotypes 3 et 6 sont les plus courants avec respectivement 15 et 12 souches répertoriées entre 2000 et 2008. Concernant les *Legionella non pneumophila*, *Legionella*

longbeachae semble se démarquer avec au minimum une souche isolée tous les ans depuis 2003. La plus ou moins grande prévalence de ces souches parmi les prélèvements cliniques pourrait être le reflet de leur virulence et donc de leur capacité à infecter l'homme.

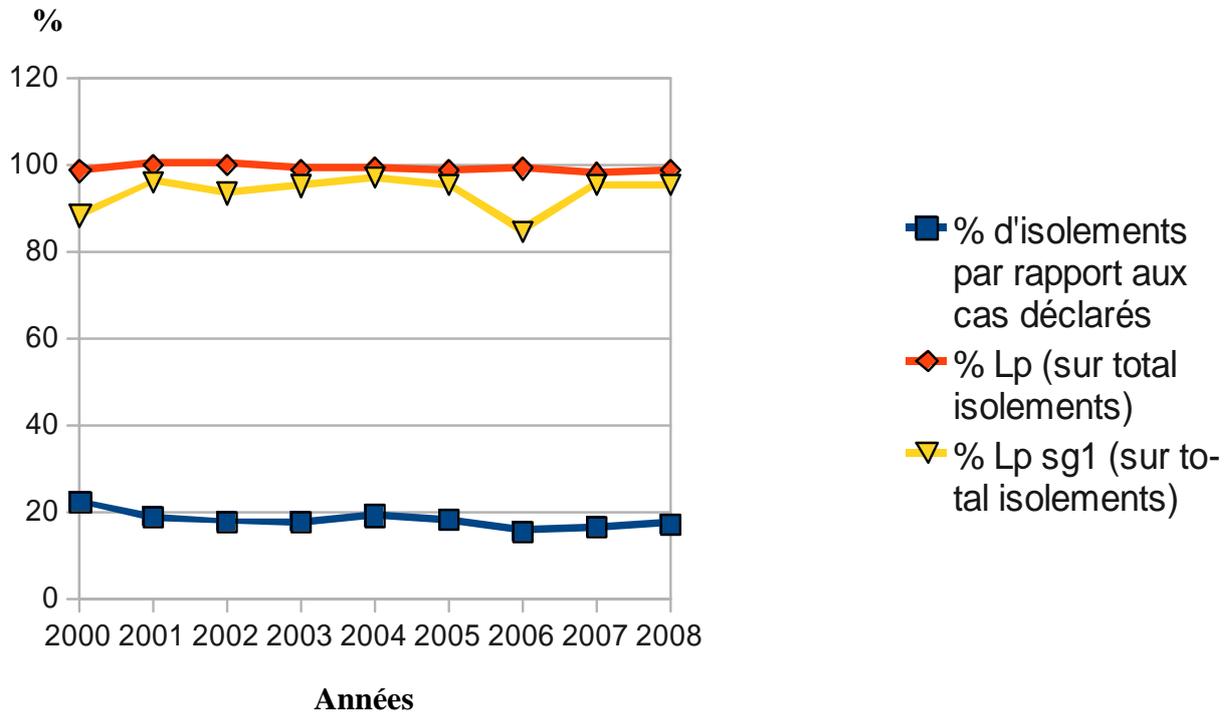


Figure 31 : Représentation de l'évolution du pourcentage d'isolements de bactéries parmi les cas de maladie du légionnaire diagnostiqués en France de 2000 à 2008 et des proportions de *Legionella pneumophila* (Lp) et *Legionella pneumophila* sg 1 (Lp sg1) parmi ces isolements.

(graphique réalisé d'après les données issues des bulletins épidémiologiques de 2000 à 2008)

Tableau 18 : Évolution du nombre de souches d'origine clinique isolées en France depuis 2000 et répartition des isolements de légionelles par espèces et par sérogroupes.
(Étienne et Jarraud, 2008)

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements								
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
<i>Legionella pneumophila</i>	133	150	179	179	227	272	220	224	210*
séro groupe 1	119	144	167	172	222	263	188	218	203*
séro groupe 2		1	1			1		1	
séro groupe 3	4	1	3	2		1	4		1*
séro groupe 4									1
séro groupe 5	1				2	1	1	1	2
séro groupe 6			2	2	3	2	2		1
séro groupe 7	1						1	2	
séro groupe 8				2		2	1	1	1*
séro groupe 10							1		
séro groupe 14									1
séro groupe indéterminé*	8	4	3	1		2	2	1*	
<i>Legionella non pneumophila</i>	2	0		2		4	2	3	3
<i>Legionella dumoffii</i>	1								
<i>Legionella micdadei</i>							1		
<i>Legionella longbeachae</i>				1	2	1	1	1	2
<i>Legionella anisa</i>			2					1	
<i>Legionella tucsonensis</i>			1						
<i>Legionella gormanii</i>				1					1
<i>Legionella bozemanii</i>						1			
<i>Legionella feelei</i>						1			
<i>Legionella cincinnatiensis</i>						1			
<i>Legionella wadsworthii</i>								1	
Total	135	150	179	181	229	276	222	233	213*

**Legionella pneumophila* de séro groupe indéterminé en raison de réactions croisées en immunofluorescence directe.

* Parmi ces 213 souches, 1 souche Lp3 et 1 souche Lp8 isolées de patient pour lesquels le cas de légionellose n'a pas été retenu par l'InVS.

6. Caractéristiques génotypiques des souches

Nous l'avons vu, il est possible de déterminer l'espèce et le séro groupe de la bactérie par culture. Cependant, dans une démarche d'investigation et d'identification de la source de contamination, cela n'est pas suffisant. Il est en effet indispensable de déterminer, par typage moléculaire, la souche clinique de légionelles afin de pouvoir la comparer aux souches isolées de l'environnement.

En France, c'est le CNRL qui collecte systématiquement toutes les souches de légionelles isolées de patients et qui réalise le typage moléculaire de toutes les *L. pneumophila* sg 1 (la plus couramment rencontrée en pathologie humaine). Ceci a pour objectifs :

- l'identification des cas groupés par la comparaison de toutes les souches d'origine clinique isolées en France grâce à la constitution d'une base de données de profils électrophorétiques,
- l'identification des sources de contamination par la comparaison de souches d'origine clinique à des souches isolées d'environnement « épidémiologiquement reliées »,
- le suivi dans l'espace et dans le temps des souches bactériennes responsables des cas de maladie du légionnaire.

La technique de référence utilisée par le CNRL pour le typage des souches est l'électrophorèse en champs pulsés. Elle est considérée comme la technique de référence pour le typage des souches depuis plus de 15 ans (Lück *et al.*, 1998 ; Fry *et al.*, 1999 ; Jonas *et al.*, 2000). Elle repose sur l'utilisation de l'enzyme *SfiI* puis l'analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total. Ces profils sont alors analysés grâce au logiciel Gel Compar® afin de constituer une base de données. Le typage des souches est réalisé uniquement par isolement à partir d'une culture de la bactérie (réalisé chez 20 % des patients).

Une fois le génotypage réalisé, l'InVS classe les souches bactériennes en trois catégories distinctes : les souches sporadiques, épidémiques et endémiques (cf glossaire). Entre 1995 et 2007, sur l'ensemble des souches isolées, il y avait 73 % de souches sporadiques, 7 % de souches épidémiques et 20 % de souches endémiques (BEH 30-31, 2008).

Seule l'évolution des souches endémiques est documentée dans les bulletins épidémiologiques de l'InVS. Leur implication dans les cas de maladie du légionnaire semble augmenter ces dernières années. Alors qu'elles étaient responsables de plus de 29 % des cas diagnostiqués par culture en 2006 et 2007, on en compte 34 % en 2008. Au total, 5 souches endémiques majeures ont pu être caractérisées, elles sont dénommées Paris, Louisa, Lorraine, Mondial et Biarritz. Selon l'InVS (BEH n° 30/31, 2008), la souche Paris a été l'une des premières souches caractérisées et a été la plus couramment isolée jusqu'en 2003 (Figure 32). Elle représentait alors en moyenne près de 9 % des isolats cliniques français avec un pic de fréquence de 17 % des isolats en 2000. Depuis 2002, c'est la souche Lorraine qui émerge en France et correspond aujourd'hui à environ 10 % des isolats. Elle a comme caractéristiques d'être hautement prévalente parmi les isolats cliniques et très rarement isolée dans l'environnement. La souche Louisa, détectée pour la première fois en 2002, émerge également depuis 2004. Son taux d'isolement a progressivement augmenté jusqu'en 2008 pour atteindre la deuxième place des souches endémiques

le plus souvent retrouvées dans les isolats cliniques (plus de 7 % des isolats). Les souches Biarritz et Mondial sont moins représentées en France ; la souche Mondial est d'ailleurs en déclin depuis son apparition en 1998, diminuant progressivement de 8 % en 1998 à 1 % en moyenne depuis 2003 (Figure 32). Aucune explication à ces différentes évolutions n'est avancée dans la littérature. Il est possible que cela reflète des adaptations plus ou moins efficaces de ces souches à leur environnement ou aux techniques de traitement utilisées.

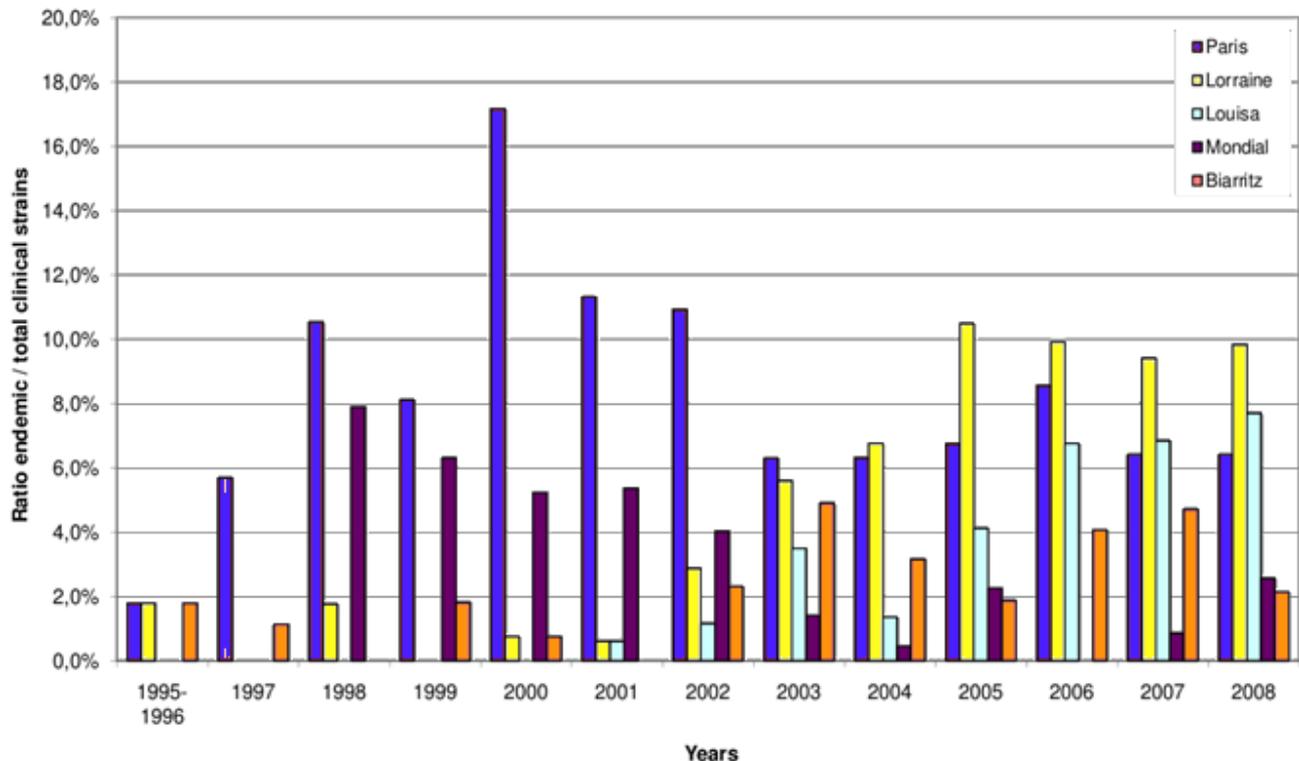


Figure 32 : Évolution des souches endémiques de *Legionella pneumophila* sg 1 en France de 1995 à 2008.
(Etienne et Jarraud, 2008)

7. Expositions à risque

Les expositions à risque correspondent à la fréquentation de lieux susceptibles d'être à l'origine d'une transmission de légionelles. Les principaux lieux recensés dans la fiche de déclaration obligatoire (cf Annexe) sont : les hôpitaux, stations thermales, maisons de retraite, hôtels, campings, piscines et jacuzzis. Le relevé de ces informations est essentiel à l'orientation des recherches de la source de contamination afin de la gérer au plus vite. Ces données, issues de l'InVS, sont répertoriées sur la figure 33 tout au long de la période 1996-2008. Notons que l'InVS

ne fait pas de distinction entre les cas sporadiques et épidémiques (par exemple, les cas liés aux voyages peuvent être aussi bien isolés que groupés, cf glossaire).

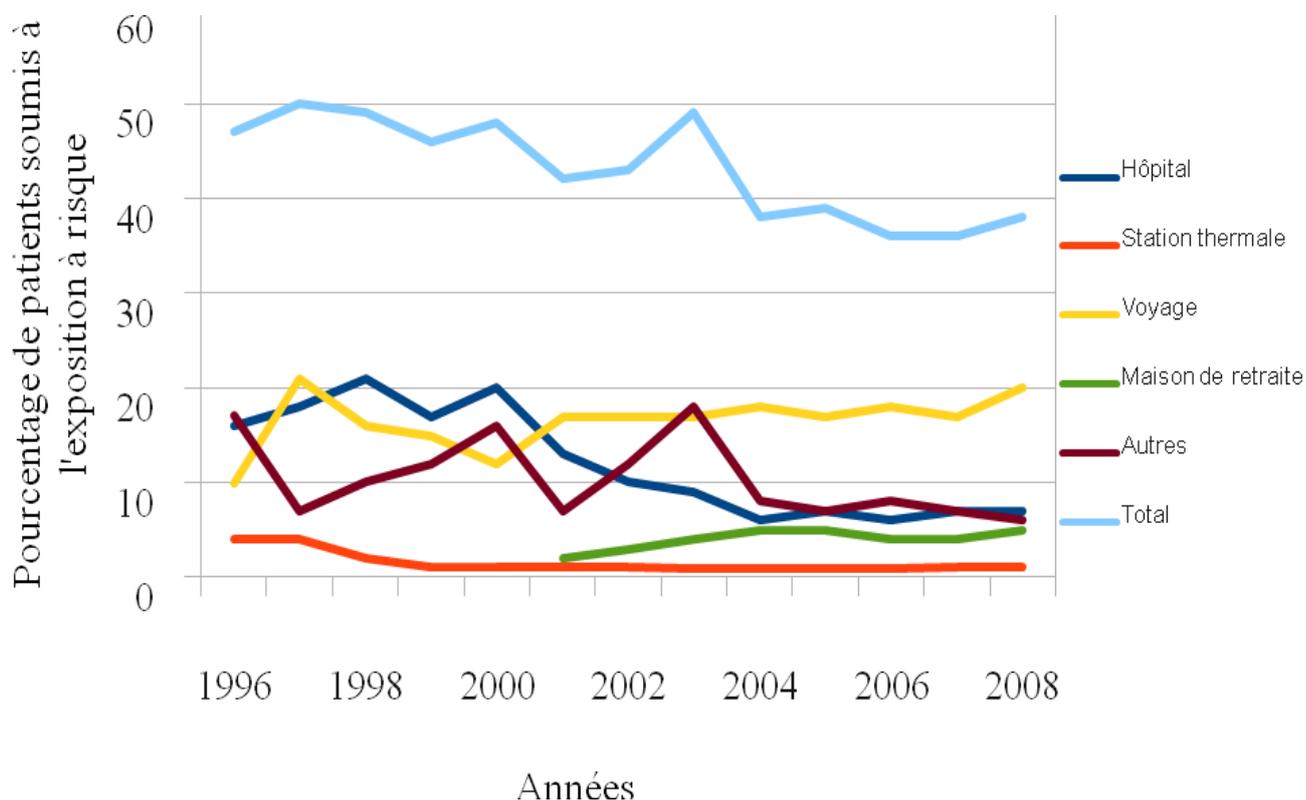


Figure 33 : Représentation de l'évolution des expositions à risque répertoriées chez les patients atteints de la maladie du légionnaire de 1996 à 2008.

(graphique réalisé d'après les données de la DO collectées sur le site de l'InVS)

La catégorie « Autres expositions » regroupe à la fois d'autres types d'exposition minoritaires (par exemple des fontaines décoratives) mais également des cas liés à des épidémies pour lesquelles l'exposition en cause ne correspond à aucune de celles précisées précédemment.

Nous détaillerons plus particulièrement les deux principaux lieux soupçonnés être à l'origine de cas de maladie du légionnaire en 2008 à savoir : les hôpitaux et les lieux liés aux voyages (hôtel, camping, et résidences secondaires).

Il apparaît que le pourcentage de cas ayant fréquenté des stations thermales, maison de retraite ou ayant voyagé, est assez stable sur les vingt dernières années. A l'inverse, les cas nosocomiaux (cf glossaire) semblent avoir connu une baisse conséquente de près de 10 points entre 1996 et 2008. Cette diminution est sans doute à mettre en lien avec les mesures prises pour contrôler le risque « légionelles » après la circulaire de 1998 (DGS, 1998). Celle-ci informait les responsables des établissements de santé sur la nécessité :

- d'assurer un entretien régulier du réseau d'eau de l'établissement conformément aux indications de la circulaire du 24 avril 1997,
- de mettre en œuvre une surveillance de la contamination des réseaux par la recherche de légionelles sur des prélèvements effectués dans les réservoirs, ballons d'eau, installations à risque, ainsi qu'aux points d'usage,
- de formaliser les procédures d'utilisation de l'eau pour les soins et pour la désinfection des dispositifs médicaux,
- de rechercher systématiquement une maladie du légionnaire lors de la survenue d'une pneumopathie chez un patient hospitalisé.

Aujourd'hui, grâce à ces mesures de sensibilisation, de prévention et de précaution, l'hôpital n'est plus la première « exposition à risque » ; il est loin derrière les cas liés aux voyages (20 % des cas). Cela est révélateur des efforts de prévention et de contrôle qu'il reste à fournir dans ces établissements et lieux d'accueil du public. Toutefois, en 2007, il a semblé que les gestionnaires des établissements de tourisme aient été plus sensibilisés car les investigations effectuées lors de cas groupés Ewgli montrent une diminution du pourcentage des établissements avec des taux de contamination supérieurs au seuil de 10^3 UFC/mL (BEH 30-31, 2008).

8. Sources de contamination

Même si l'on soupçonne parfois un lieu d'être à l'origine d'une contamination, du fait de sa fréquentation par le (ou les) patient(s), la source même de l'infection (réseau d'eau, TAR, ...) n'est pas toujours clairement identifiée.

Les cas de maladie du légionnaire les plus courants sont sporadiques ; cependant, par manque de documentation, nous traiterons des sources de contamination à travers l'étude des épidémies (beaucoup plus documentées). Une revue des principales épidémies survenues en France depuis 1998 a permis de déterminer les caractéristiques de chacune d'elles en termes de sources de contamination et parfois de souches impliquées (Tableau 19).

Tableau 19 : Sources des principales épidémies répertoriées de 1998 à 2007.
(BEH)

Années de l'épidémie	Villes concernées	Nombre de cas	Sources	Souches impliquées
1998	Paris	20	TAR identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1
1999	Paris	8	TAR identifiée	
2000	Rennes	22	TAR identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1, souche « Rennes »
2001	Limoges	4	Pas de source identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1
	Lyon	20	Pas de source identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1, profil de type Paris (pour un cas uniquement)
2002	Lyon	14	TAR suspectée	<i>L. pneumophila</i> sg 1, retrouvée cliniquement uniquement
	Grenoble	5	Pas de source identifiée	
	Colmar	5	Pas de source identifiée	
	Meaux	22	TAR d'un hôpital identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1, profil type Paris
	Nice	9	Pas de source identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 6 probable
	Sarlat	31	TAR d'un hôpital identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1
2003	Poitiers	24	TAR identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1
	Montpellier	31	TAR fortement suspectée	<i>L. pneumophila</i> sg 1
2003-2004	Pas de Calais	86	TAR identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1
2004	Soulac-sur-mer	7	réseau de distribution d'eau	<i>L. pneumophila</i> sg 1 isolée chez un cas seulement
	Thionville	7	Pas de source identifiée	
	Nancy	11	TAR suspectée	
	Strasbourg	10	Pas de source identifiée	
2005	Lyon	34	TAR suspectée	<i>L. pneumophila</i> sg 1, profil type Lorraine
	Paris	9	Pas de source identifiée	
	Strasbourg	7	TAR suspectée	
	Renne	8	TAR identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1, souche « Rennes »
2006	Paris	29	TAR identifiée	
	Reuil-Malmaison	13	TAR suspectée	<i>L. pneumophila</i> sg 1, profil type Lorraine suspectée
	Essonne	12	TAR identifiée	
	Biarritz	6	Réseau d'eau sanitaire	
	Lorquin	15	SPA suspecté	<i>L. pneumophila</i> sg 1, profil type Lorraine suspectée
2007	Alpes-maritimes	19	TAR fortement suspectées	<i>L. pneumophila</i> sg 1
	Savoie	3	SPA suspecté	
2008	Paris (La Madeleine)	9	Pas de source identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1, profil de type Mondial
	Marmande	8	Pas de source identifiée	<i>L. pneumophila</i> sg 1
	Saint Maurice de Lignon	4	TAR identifiées	<i>L. pneumophila</i> sg 1

Trente-deux épidémies ont été recensées. Pour 18 d'entre elles (59 %), une tour aérorefrigérante a été suspectée ou identifiée comme étant la source de la contamination contre 6 % de réseaux d'eau. Il est vrai que les TAR sont un moyen très efficace pour les légionelles d'infecter un nombre important d'individus. Outre le fait qu'elles présentent toutes les caractéristiques favorisant le développement des bactéries (humidité, température élevée, nutriments...), elles permettent une excellente dissémination de celles-ci. En effet, le panache qui se dégage des tours aérorefrigérantes est constitué de fines gouttelettes pouvant contenir des bactéries. Même si l'aérosolisation peut altérer la survie des bactéries, cela est peut être en partie compensé par le très grand nombre d'individus susceptibles d'inhaler l'aérosol. Pour exemple, l'épidémie du Pas-de-Calais a montré qu'une tour aérorefrigérante pouvait avoir des retombées sur un rayon de 14 km. Cette épidémie a été la plus importante connue en France depuis la découverte de la maladie du légionnaire avec 86 individus atteints. Elle explique probablement le saut effectué par la courbe représentant la catégorie « autres expositions à risque » en 2003 (Figure 33).

Les implications répétées des tours aérorefrigérantes dans les épidémies de la maladie du légionnaire depuis plusieurs années montrent bien que ces installations ont une place majeure dans la propagation de la maladie, d'où l'importance d'un contrôle de celles-ci. Malgré les mesures déjà prises pour prévenir la contamination de ces TAR (recensement des installations, recommandation d'entretien et de surveillance de contaminations), de nombreux efforts restent à fournir pour limiter le risque « légionelles ».

Les autres sources connues d'épidémies sont des réseaux d'eau (6 %) et pour deux d'entre elles (6 %) des spas sont suspectés. Pour toutes les autres (32 % des épidémies), aucune source de contamination n'a pu être identifiée. Ceci met en lumière toute la difficulté des enquêtes environnementales. Pour considérer qu'une installation est à l'origine d'un cas, il faut retrouver la même souche à la fois chez le patient et au niveau de cette installation. Or souvent, des souches cliniques et environnementales sont retrouvées mais sans que l'on observe de concordance entre les deux. Dans ce cas, les enquêtes épidémiologiques s'avèrent très utiles puisqu'elles permettent parfois de suspecter fortement une installation au vu des déplacements et activités de chacun des patients.

Conclusion

La maladie du légionnaire fait partie, depuis 1987, des maladies à déclaration obligatoire. Dès lors, l'InVS a recueilli les signalements de cas par le biais d'un système de surveillance impliquant un grand nombre d'acteurs (médecins, biologistes, DDASS, CNRL, ...). A partir de ces informations, l'objectif de ce travail a consisté à décrire et dans la mesure du possible expliquer l'évolution des données épidémiologiques de la maladie du légionnaire durant ces vingt dernières années en France. Cela a concerné tant les caractéristiques du patient lui-même (âge, facteurs prédisposants, sexe, expositions à risque) que celles de la bactérie (phénotype, génotype).

Nous avons remarqué une augmentation importante du nombre de cas depuis 1997, coïncidant avec le renforcement du système de surveillance de la pathologie. A ceci s'ajoute une amélioration des méthodes de diagnostic qui permettent aujourd'hui une prise en charge plus rapide du patient. Cela explique probablement en partie la baisse du taux de létalité observée depuis 2000. A contrario, le sexe ratio de la maladie est resté, ces vingt dernières années, en faveur des femmes (une femme atteinte pour trois hommes). Notre hypothèse repose essentiellement sur le fait que les facteurs prédisposant à la maladie sont plus souvent retrouvés chez les hommes.

Concernant l'évolution des souches de *Legionella* isolées des patients durant la période 1987-2008, on a pu noter une augmentation constante de *Legionella pneumophila* sg 1. Cependant, l'apparition d'une nouvelle technique de diagnostic spécifique de *L. pneumophila* sg 1 (l'antigénurie) pourrait expliquer au moins en partie cette évolution. D'autre part, le CNRL suit l'incidence des principales souches de *L. pneumophila* sg 1 (Paris, Louisa, Lorraine, Mondial et Biarritz) parmi les patients depuis 1995. Il est encore difficile à l'heure actuelle d'expliquer pourquoi certaines de ces souches émergent et inversement.

Enfin, notons que les tours aérorefrigérantes sont, parmi les installations à risque, les plus souvent responsables d'épidémies et ce malgré les efforts de prévention entrepris ces dernières années. Devant les difficultés à traiter les réseaux contaminés par *Legionella*, la prévention reste encore aujourd'hui la clé d'une limitation du risque *Legionella* pour la population.

Glossaire

Aérobic : se dit des microbes qui ont besoin pour vivre de la présence d'oxygène libre. De façon plus générale, se dit de tout phénomène ou métabolisme tributaire de l'oxygène (Pasteur). (Delamare, J., 2000)

Anaérobic : se dit des microbes qui ne peuvent vivre au contact de l'air ou de réactions chimiques qui se feront à l'abri de l'air (fermentations) (Pasteur). (Delamare, J., 2000)

Amensalisme : Interaction dans laquelle une espèce est éliminée par une autre qui secrète une substance toxique. (Dajoz, 2006)

Bactéricide : qui tue les bactéries. Pouvoir bactéricide : « La plus faible concentration d'une substance capable d'amener la destruction définitive de la vitalité d'un microbe » (J. Lavagne). (Delamare, J., 2000)

Bactériostatique : se dit de l'action de certaines substances (antiseptique, antibiotique), qui suspendent la division bactérienne, entraînent le vieillissement de la bactérie et sa mort si la dose est suffisante. Pouvoir bactériostatique : « La plus faible concentration d'une substance capable d'amener l'arrêt du développement de la culture d'un microbe, sans tuer ce dernier » (J. Lavagne). (Delamare, J., 2000)

Cas groupés de maladie du légionnaire : au moins 2 cas, survenus dans un intervalle de temps inférieur à 6 mois, chez des personnes ayant fréquenté le même lieu (BEH n°12, 2000).

Cas nosocomiaux de maladie du légionnaire : les cas nosocomiaux sont dits certains lorsque les malades ont été hospitalisés durant la totalité de la période d'incubation (10 jours), et ils sont probables si les patients n'ont été hospitalisés que pendant une partie de cette période d'incubation. Tous les autres cas n'étant pas survenus à l'hôpital sont dits communautaires (BEH n°30/31, 2008).

Cas de maladie du légionnaire liés aux voyages : tous cas de maladie du légionnaire survenu chez une personne ayant voyagé pendant les 10 jours précédant le début de la maladie (BEH n°30/31, 2008).

Cas de maladie du légionnaire liés à une station thermale : individus ayant fréquenté une station thermale dans les 10 jours précédant le début de la maladie (BEH n°30/31, 2008).

Cas de maladie du légionnaire liés à une maison de retraite : individus ayant fréquenté ce type d'établissement dans les 10 jours précédant le début de la maladie (BEH n°30/31, 2008).

Espèce bactérienne : en bactériologie, une espèce est constituée par sa souche type et par l'ensemble des souches considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluses au sein de la même espèce. (<http://www.bacteriologie.net/generale/definitions.html>)

Parasitisme : action pour un être de vivre aux dépens d'un autre être (appelé hôte) en lui portant préjudice mais sans le détruire. (<http://www.afwa-hq.org/fr/glossaire.inc.php>)

Souche (bactérienne) : population d'organisme qui descend d'un organisme unique ou d'un isolat d'une culture pure. (Prescott *et al.*, 1999)

Souches sporadiques : elles possèdent un génotype unique et spécifique n'ayant jamais été documenté auparavant et atteignent des individus isolément (= cas sporadique) (BEH n°30/31, 2008).

Souches épidémiques : elles présentent un génotype spécifique pour une épidémie et sont responsables de cas de maladie du légionnaire regroupés dans le temps et l'espace (BEH n°30/31, 2008).

Souches endémiques : elles regroupent des souches présentant un même génotype mais isolées chez des cas sans lien épidémiologique. Elles sont responsables de cas sporadiques mais peuvent aussi être impliquées dans des épidémies (BEH n°30/31, 2008).

Annexe

Questionnaire à retourner à la DDASS de :

LEGIONELLOSE

- Maladie à déclaration obligatoire (décret du 10-06-1986, modifié en 1987)
- Droit d'accès et de rectification par l'intermédiaire du médecin déclarant (loi du 06-01-1978)
- Centralisation des informations au Réseau National de Santé Publique

CRITERES DE DECLARATION : Pneumopathie associée à au moins un des résultats suivants :

- cas confirmé :*
1. **isolement** de *Legionella spp.* dans un prélèvement clinique
 2. **augmentation du titre d'anticorps** (x4) avec un 2ème titre minimum de 128
 3. **immunofluorescence directe** positive
 4. présence **d'antigène soluble urinaire**
- cas possible :*
5. **titre d'anticorps élevé** (≥ 256)

CARACTERISTIQUES DU PATIENT Initiale du nom _____ Prénom _____

Date de naissance |__|_|_|_|_| Sexe M F Code postal du domicile _____

Profession : _____

CLINIQUE Date des premiers signes |__|_|_|_|_|

Pneumopathie confirmée radiologiquement : oui non

Evolution : Guérison Encore malade Décès si oui, date décès |__|_|_|_|_|

	CONFIRMATION DU DIAGNOSTIC			Sérologie	
	Pos	Nég	Non effectué	1er prélèv. Date	2ème prélèvement Date
Culture	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Immuno. directe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Titre 1 :	Titre 2 :
Antigène soluble urinaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> En cours <input type="checkbox"/> Non effectué	<input type="checkbox"/> En cours <input type="checkbox"/> Non effectué

Espèce/sérogroupe : *L. pneumophila* sérogroupe 1 Autre espèce (préc) _____

L. pneumophila autre sérogroupe (préc) : _____ En cours

FACTEURS FAVORISANTS

Hémopathie ou cancer Corticothérapie Autres immunosuppresseurs
 Tabacisme Diabète Autres préciser :

EXPOSITIONS A RISQUE (dans les 10 jours précédant les premiers signes de légionellose)

	Oui	Non	Période	Hôpital : _____
Hôpital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du __ __ __ au __ __ __	Service : _____
Station thermale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du __ __ __ au __ __ __	Lieu : _____

Indiquer précisément les lieux (ville, pays) et types d'hébergement (adresse)

Voyage, hôtel, camping,...	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du __ __ __ au __ __ __ _____
			du __ __ __ au __ __ __ _____
			du __ __ __ au __ __ __ _____

Piscine, jacuzzi.. préciser _____
Autre exposition préciser _____

NOTION DE CAS GROUPES (cas liés aux mêmes lieux d'exposition dans les 6 derniers mois)

Oui Non Si oui, préciser :

MEDECIN DECLARANT

Date de déclaration |__|__|__|

Nom : _____ Adresse : _____

Tél : _____ Signature et tampon

N. B. Si une enquête environnementale a eu lieu, merci de joindre une copie du rapport à cette fiche de déclaration

Bibliographie

- Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C., Harb, O.S., 1998.** Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3127-3133.
- Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Harb, O.S., Stone, B.J., 1997.** Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. Mol. Microbiol. 24, 629-642.
- Abu Kwaik, Y., 1996.** The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoa *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. Appl. Environ. Microbiol. 13, 243-251.
- Addiss, D.G., Davis, J.P., La Venture, M., Wand, P.J., Hutchinson, M.A., MacKinney, R.M., 1989.** Community-acquired Legionnaires' Disease Associated with a Cooling Tower : Evidence for Longer-Distance Transport of *Legionella pneumophila*. Am. J. Epidemiol. 130(3), 557-568.
- Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshvar, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M., Harrison, T.G., Weyant, R.S., Birtles, R.J., Raoult, D., Halablab, M.A., 2001.** *Legionella drozanskii* sp. nov. and *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov. : three unusual new *Legionella* species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1151-1160.
- Adeleke, A.A., Pruckler, J.M., Benson, R.F., Rowbotham, T., Halablab, M.A., Fields, B.S., 1996.** *Legionella*-like amebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease. Emerg. Infect. Dis. 2(3), 225-229.
- Ader, 2006.** DESC (Diplôme d'Etudes spécialisées Complémentaires), Maladies infectieuses et tropicales.
- Aguero-Rosenfeld, M.E., Edelstein, P.H., 1988.** Retrospective evaluation of the Du Pont radioimmunoassay kit for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigenuria in human. J. Clin. Microbiol. 26(9), 1775-1778.
- Alary, M., Joly, J.R., 1992.** Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by *Legionellae*. J. Infect. Dis. 165(3), 565-569.
- Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., Buchrieser, C., 2007.** *Legionella pneumophila* – a human pathogen that co-evolved with fresh protozoa. Cell. Mol. Sci. 64, 432-448.
- Albrechtsen, H.J., 2002.** Microbiological investigations of rainwater and graywater collected for toilet flushing. Water Sci. Technol. 46(6-7), 311-316.
- Alexiou, S.D., Antoniadis, A., Papapaganagiotou, J., Stefanou, T.H., 1989.** Isolation of *Legionella pneumophila* from hotels in Greece. Eur. J. Epidemiol. 5(1), 47-50.

- Allen, T.P., Fried, J.S., Wiegmann, T.B., Hodges, G.R., Dixon, A.Y., Lee, S.H., MacDougall, M.L., 1985.** Legionnaires' disease associated with rash and renal failure. *Arch. Intern. Med.* 145, 729-730.
- Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C., Frère, J., 2008.** Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr. Microbiol.* 57(5), 497-502.
- Amano, K.I., Williams, J.C., 1983.** Peptidoglycan of *Legionella pneumophila* : apparent resistance to lysosyme hydrolysis correlates with a high degree of peptide cross-linking. *J. Bacteriol.* 153(1), 520-526.
- Aragon, V., Kurtz, S., Flieger, A., Neumeister, B., Cianciotto, N.P., 2000.** Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 68, 1855-1863.
- Armstrong, T., 2004.** A quantitative microbial risk assessment model for human inhalation exposure to *Legionella*. Thèse de Sciences, Université Drexel, Philadelphie. p211.
- Atlas, R.M., Williams, J.F., Huntington, M.K., 1995.** *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4), 1208-1213.
- Bangsborg, J.M., Uldum, S., Jensen, J.S., Bruun, B.G., 1995.** Nosocomial legionellosis in three heart-lung transplant patients : case reports and environmental observations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14(2), 99-104.
- Barbaree, J.M., Fields, B.S., Feeley, J.C., Gorman, G.W., Martin, W.T., 1986.** Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (2), 422-4.
- Barker, J., Scaife, H., Brown, M.R., 1995.** Intraphagocystic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2684-2688.
- Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., Gilbert, P., 1992.** Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga* : physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2420-2425.
- Baron, P.A., Willeke, K., 1986.** Respirable droplets from whirlpools : measurements of size distribution and estimation of disease potential. *Environ. Res.* 39(1), 8-18.
- Baskerville, A., 1984.** Pathology and pathophysiology. In : *Legionella* : Proc. 2nd Int. Symp., June 19-23, 1983. Atlanta, G.A., Thornsberry, C., Balows, A., Feeley, J.C., Jakubowski, W. (eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C. p136-140.
- Baskerville, A., Fitzgeorge, R.B., Broster, M., Hambleton, P., Dennis, P.J., 1981.** Experimental transmission of legionnaires' disease by exposure of *Legionella pneumophila*. *Lancet.* 2(8260-61), 1389-1390.
- Bej, A. K., Mahbubani, M.H., Atlas, R.M., 1991.** Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 597-600.

- Bellinger-Kawahara, C., Horwitz, M.A., 1990.** Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* 172 (4), 1201-10.
- Bemer, P., Leautez, S., Ninin, E., Jarraud, S., Raffi, F., Drugeon, H., 2002.** *Legionella pneumophila* arthritis : use of medium specific for Mycobacteria for isolation of *L. pneumophila* in culture of articular fluid specimens. *Clin. Infect. Dis.* 35, E6-7.
- Benhamou, D., Bru, J.P., Chidiac, C., Etienne, J., Léophonte, P., Marty, N., Poirier, R., Rouquet, R.M., 2005.** Légionellose : définition, diagnostic et traitement. *Med. Mal. Infect.* 35(1), 1-5.
- Benin, A.L., Benson, R.F., Arnold, K.E., Fiore, A.E., Cook, P.G., Williams, L.K., Fields, B., Besser, R.E., 2002.** An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever : the need for enhanced surveillance of travel – associated legionellosis in the United States. *J. Infect. Dis.* 185(2), 237-243.
- Benson, R.F., Fields, B.S., 1998.** Classification of the genus *Legionella*. *Semin.Respir.Infect.* 13 (2), 90-99.
- Benson, R.J., Thacker, W.L., Daneshvar, M.I., Brenner, D.J., 1996.** *Legionella waltersii* sp. nov. and an unnamed *Legionella* genomospecies isolated from water in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(3), 631-634.
- Berendt, R.F., Young, H.W., Allen, R.G., Knutsen, G.L., 1980.** Dose-reponse of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*. *J. Infect. Dis.* 141(2), 186-192.
- Berger, K.H., Isberg, R.R., 1993.** Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 7, 7-19.
- Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W., Ashburn, R.J., 1998.** Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 279-286.
- Bezanson, G., Burbrige, S., Haldane, D., Yoell, C., Marrie, T., 1992.** Diverse populations of *Legionella pneumophila* present in the water of geographically institutions served by the same water reservoir. *J. Clin. Microbiol.* 30(3), 570-576.
- Bhopal, R., 1995.** Source of infection for sporadic Legionnaires' disease : a review. *J. Infect.* 30(1), 9-12.
- Birtles, R.J., Roxbotham, T.J., Raoult, D., Harrison, T.G., 1996.** Phylogenetic diversity of intra-amoebal *legionellae* as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Microbiology.* 142, 3525-3530.
- Blatny, J.M., Reif, B.A.P., Skogan, G., Andreassen, O., Hoiby, E.A., Ask, E., Waagen, V., Aanonsen, D., Aaberge, I.S., Caugant, D.A., 2008.** Tracking airborne *Legionella* and *Legionella pneumophila* at a biological treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7360-7367.

- Blatt, S.P., Parkinson, M.D., Pace, E., Hoffman, P., Dolan, D., Lauderdale, P., Zajac, R.A., Melcher, G.P., 1993.** Nosocomial Legionnaires' disease : aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am. J. Med.* 95(1), 16-22.
- Blazquez-Garrido, R.M., Espinosa-Parra, F.J., Alemany-Frances, L., Ramos-Guevara, R.M., Sanchez-Nieto, J.M., Segovia-Hernandez, M., 2005.** Antimicrobial chemotherapy for legionnaires disease : levofloxacin versus macrolides. *Clin. Infect. Dis.* 40, 800-6.
- Bohach, G.A., Synder, I.S., 1983.** Characterization of surfaces involved in adherence of *Legionella pneumophila* to *Fisherella* species. *Infect. Immun.* 42, 318-325.
- Bollin, G.E., Plouffe, J.F., Para, M.F., Hackmann, B., 1985.** Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water-faucets. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(5), 1128-1131.
- Bonnard, M., 2001.** Le risqué biologique et la methode d'évaluation du risqué – Rapport final Unité d'Evaluation des Risques Sanitaires, INERIS. p70.
- Borella, P., Montagna, T.M., Stampi, S., Stancanelli, G., Romano-Spica, V., Triassi, M., Marchesi, I., Bargellini, A., Tato, D., Napoli, C., Zanetti, F., Leoni, E., Moro, M., Scaltriti, S., Ribera D'alcala, G., Santarpia, R., Boccia, S., 2005.** *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10), 5805-5813.
- Bornstein, N., Fleurette, J., 1992.** *Legionella*, In Manuel de bactériologie clinique, Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C. (Eds), 2^{ème} édition, édition Elsevier, Paris, 1061-1087.
- Bornstein, N., Fleurette, J., Bosshard, S., Bouvet, C., Thouvenot, D., Aymard, M., 1984.** Evaluation de la fréquence des reactions sérologiques croisées entre *Legionella* et *Mycoplasma* ou *Chlamydia*. *Path. Biol.* 32(3), 165-168.
- Bosshardt, S.C., Benson, R.F., Fields, B.S., 1997.** Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*. *Microb. Pathog.* 23 (2), 107-12.
- Bozue, J.A., Johnson, W., 1996.** Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 64 (2), 668-73.
- Breiman, R.F., Fields, B.S., Sanden, G.N., Volmer, L., Meier, A., Spika, J.S., 1990a.** Association of shower use with legionnaires' disease. *JAMA.* 263(21), 2924-2926.
- Breiman, R.F., Cozen, W., Fields, B.S., Mastro, T.D., Carr, S.J., Spika, J.S., Mascola, L., 1990b.** Role of air sampling in investigation of an outbreak of Legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser. *J. Infect. Dis.* 161, 1257-1261.
- Breimer, R.F., Fields, B.S., Sanden, G.N., Volmer, L., Meirer, A., Spika, J.S., 1990.** Association of shower use with legionnaires' disease. *JAMA*, 263(21), 2924-2926.
- Breimer, R.F., Horwitz, M.A., 1987.** Guinea-pigs sublethally infected with aerosolized *Legionella pneumophila* develop humoral and cell-mediated immune responses and are protected against lethal aerosol challenge. *J. Exp. Med.* 164, 799-811.

- Brieland, J.K., Fantone, J.C., Remick, D.G., LeGendre, M., McClain, M., Engleberg, N.C., 1997a.** The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect. Immun.* 65 (12), 5330-3.
- Brieland, J.K., McClain, M., LeGendre, M., Engleberg N.C., 1997b.** Intrapulmonary *Hartmannella vermiformis* : a potential niche for *Legionella pneumophila* replication in a murine model of legionellosis. *Infect. Immun.* 65, 4892-4896.
- Brieland, J.K., Freeman, P., Kunkel, R., Chrisp, C., Hurkel, M., Fantone, J., Engleberg, N., 1994.** Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in tracheally inoculated ArJ mice. A murine model of human Legionnaires' disease. *Am. J. Pathol.* 145, 1537-1546.
- Broahead, A.N., Negron-Alvira, A., Baez, L.A., Hazen, T.C., Canoy, M.J., 1988.** Occurrence of *Legionella* species in tropical rain water cisterns. *Caribb. J. Sci.* 24(1-2), 71-73.
- Brooks, T., Osicki, R.A., Springthorpe, V.S., Sattar, S.A., Fillion, L., Abrial, D., Riffard, S., 2004.** Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *J. Tox. Environ. Health.* 67, 1845-1859.
- Brown, C.M., Nuorti, P.J., Breiman, R.F., Hathcock, A.L., Fields, B.S., Lipman, H.B., Llewellyn, G.C., Hofmann, J., Cetron, M., 1999.** A community outbreak of Legionnaires' disease linked to hospital cooling towers : an epidemiological methods to calculate dose of exposure. *Int. J. Epidemiol.* 28, 353-359.
- Bruggemann, H., Cazalet, C., Buchrieser, C., 2006.** Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment : role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 86-94.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°38, 1991.** Les légionelloses déclarées en France de 1989 à 1990, Pelletier, A., Hubert, B.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°30, 1993.** Les cas de légionellose déclarés en France en 1991 et 1992, Michard, V., Lepoutre, A.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°41, 1995.** Les cas de légionellose déclarés en France en 1993 et 1994, Michard, V., Lepoutre, A.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°6, 1999.** Les légionelloses déclarées en France en 1997, Decludt, B., Perrocheau, V., Cerase-Feurra, V.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°12, 2000.** Les légionelloses déclarées en France en 1997, Campese, C., Decludt, B.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°52, 2000.** Les légionelloses déclarées en France en 1999, Campese, C., Decludt, B.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°42, 2001.** Les légionelloses déclarées en France en 2000, Campese, C., Decludt, B.

- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°30-31, 2002.** Les légionelloses déclarées en France en 2001, Campese, C., Decludt, B.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°32, 2003.** Les légionelloses déclarées en France en 2002, Campese, C., Che, D., Maine, C., Decludt, B.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°36-37, 2004.** Les légionelloses déclarées en France en 2003, Campese, C., Jarraud, S., Decludt, B., Jacquier, G., Che, D.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°26, 2005.** Les légionelloses survenues en France en 2004, Campese, C., Jarraud, S., Bitar, D., Maine, C., Che, D.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°26, 2006.** Les légionelloses survenues en France en 2005, Campese, C., Jarraud, S., Bitar, D., Maine, C., Che, D.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°43, 2007.** Les légionelloses survenues en France en 2006, Campese, C., Maine, C., Che, D.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°30-31, 2008.** Les légionelloses survenues en France en 2007, Van Cauteren, D., Campese, C., Jarraud, S., Maine, C., Che, D.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°30-31, 2009.** Les légionelloses survenues en France en 2008, Campese, C., Che, D.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) n°22/23, 2003.** Histoire de la consommation en France, Hill, C., Laplanche, A.
- Bulletin de l'Office Fédérale de la Santé Publique (OFSP) n°38, 2008.** La légionellose en Suisse : cas recensés de 2004 à 2008 (31 juillet 2008), 651-655.
- Burge, H.A. (Ed), 1995.** Bioaerosols. Lewis Publishers. 49-76.
- Byrd, J.J., 2000.** Morphological changes leading to the nonculturable state. In nonculturable microorganisms in the environment (Colwell, R.R., Grimes, D.J., eds), ASM Press, Washington, DC, 7-18.
- Byrne, B., Swanson, M.S., 1998.** Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. Infect. Immun. 66, 3029-3034.
- Camara-Gonzales, T., Lazaro-Moreno, T., de Andrés de Colsa, T., Orejas-Gonzales, B., 1993.** Pericarditis due to *Legionella*. An. Med. Intern. 10, 449-451.
- Canarelli, T., Cadet-Tairou, A., Palle, C., 2006.** Indicateurs de la morbidité et de la mortalité liées à l'alcool en France. Bulletin épidémiologique hebdomadaire n°34-35, p252.
- Carbon, C., Van Rensburg, D., Hagberg, L., Fogarty, C., Tellier, G., Rangaraju, M., 2006.** Clinical and bacteriologic efficacy of telithromycin in patients with bacteremic community-acquired pneumonia. Respir. Med. 100, 577-85.

Cargill, K.L., Pyle, B.H., Sauder, R.L., McFeters, G.A., 1992. Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Can. J. Microbiol.* 38(5), 423-429.

Carrington, G.O., 1979. Legionnaires' disease bacillus : inhibition by normal flora. *Clin. Microbiol. Newsl.* 1(12), 7-8.

Castor, M.L., Wastrom, E.A., Danila, R.N., Smith, K.E., Naimi, T.S., Besser, J.M., Peacock, K.A., Juni, B.A., Hunt, J.M., Bartkus, J.M., Kirkhorn, S.R., Lynfiel, R., 2005. An outbreak of Pontiac fever with respiratory distress among workers performing high-pressure cleaning at a sugar-beet processing plant. *J. Infect. Dis.* 191(9), 1530-1537.

Cazalet, C., Buchrieser, C., 2005. What do we learn from the genome of *Legionella pneumophila* ? *M/S : médecine sciences.* 21 (5), 455-457.

Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichit, M., Jarraud, S., Bouchier, C., Vandenesch, F., Kunst, F., Etienne, J., Glaser, P., Buchrieser, C., 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet.* 36 (11), 1165-73.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2000. Legionnaires' Disease associated with potting soil-California, Oregon, and Washington, May-June 2000, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 49(34), 777-778.

Centers for Disease Control and Prevention, 1997. Sustained transmission of nosocomial legionnaires' disease, Arizona and Ohio. *MMWR.* 46, 416-421.

Chandler, F.W., Roth, I.L., Callaway, C.S., Bump, J.L., Thomason, B.M., Weaver, R.E., 1980. Flagella on Legionnaires' disease bacteria: ultrastructural observations. *Ann Intern Med.* 93 (5), 711-714.

Chandler, F.W., Hicklin, M.D., Blackmon, J.A., 1977. Demonstration of the agent of Legionnaires' disease in tissue. *N. Engl. J. Med.* 297 : 1218-20.

Cheval, B., Rodriguez, J.F., Eydoux, N., Perret, T., Roussel, E., El Khoury, C., 2009. Prévalence des pathologies cardiovasculaires en médecine d'urgence dans le réseau Rescue : données liées au sexe, à l'âge et au type de prise en charge. *Journal européen des urgences.* 22(S2), A96.

Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M., Asamani, G., Hill, K., Feder, M., Rineer, J., Greenberg, J.J., Steshendo, V., Park, S.H., Zhao, B., Teplitzskaya, E., Edwards, J.R., Pampou, S., Georghiou, A., Chou, I.C., Iannuccilli, W., Ulz, M.E., Kim, D.H., Geringer-Sameth, A., Goldsberry, C., Morozov, P., Fischer, S.G., Qu, X., Rzhetsky, A., Zhang, P., Cayanis, E., De Jong, P.J., Ju, J., Kalachikov, S., Shuman, H.A., Russo, J.J., 2004. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science.* 305(5692), 1966-8.

Christie, P.J., 2001. Type IV secretion : intracellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40, 294-305.

- Christie, P.J., Vogel, J.P., 2000.** Bacterial type IV secretion : conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 8, 354-360.
- Cianciotto, N.P., 2001.** Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 331-343.
- Cianciotto, N.P., Eisenstein, B.I., Mody, C.H., Engleberg N.C., 1989.** A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J. Infect. Dis.* 162 (1), 121-6.
- Ciesielski, C.A., Blaser, M.J., Wang, W.L., 1984.** Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(5), 834-987.
- Cirillo, S.L., Bermudez, L.E., El-Etr, S.H., Duhamel, G.E., Cirillo, J.D., 2001.** *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. *Infect. Immun.* 69, 508-517.
- Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., Tompkins, L.S., 1999.** Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 67 (9), 4427-34.
- Coil, D.A., Anné, J., 2009.** Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 293(2), 271-7.
- Coleman, M.E., Marks, H.M., 1999.** Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control.* 10, 289-297.
- Colville, A., Crowley, J., Dearden, D., Slack, R.C., Lee, J.V., 1993.** Outbreak of Legionnaires' disease at a university hospital, Nottingham. *Epidemiology, microbiology and control.* *Epidemiol. Infect.* 110, 105-116.
- Colwell, R.R., 2000.** Viable but nonculturable bacteria : a survival strategy. *J. Infect. Chemother.* 6, 121-125.
- Commission de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2007.** Maladie du légionnaire en Europe, *Weekly epidemiological record*, Genève. 73, 257-263.
- Conseil supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPPF), 2005.** Le risque lié aux Légionelles, Guide d'investigation et d'aide à la gestion, Paris.
- Cordes, L.G., Fraser, D.W., 1980.** Legionellosis : Legionnaires' disease ; Pontiac fever. *Med. Clin. North. Am.* 64(3), 395-416.
- Correia, A.M., Goncalves, G., Reis, J., Cruz, J.M., Castro e Freitas, J.A., 2001.** An outbreak of legionnaires' disease in a municipality in northern Portugal. *Euro. Surveill.* 6(7-8), 121-124.
- Costa, J., Tiago, I., Da Costa, M.S., Verissimo, A., 2005.** Presence and persistence of *Legionella spp.* in groundwater, *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2), 663-671.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995.** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-45.

- Cox, C.S., 1989.** Airborne bacteria and viruses. *Sci. Prog.* 73(292), 469-499.
- Dajoz, R., 2006.** Précis d'écologie, Dunod (ed). p631.
- Dardelid, J., Lofgren, S., Malmvall, B.E., 2002.** Control of nosocomial Legionnaires' disease by keeping the circulating hot water temperature above 55 degrees C : experience from a 10-year surveillance programme in a district general hospital. *J. Hosp. Infect.* 50(3), 213-9.
- Davis, G.S., Winn, W.C., Gump, D.W., Craighead, J.M., Beaty, H.N., 1983.** Legionnaires' disease pneumonia in guinea pigs and rats produced by aerosol exposure. *Chest.* 83(5suppl), 15-16.
- Davis, G.S., Winn, W.C., Gump, D.W., Craighead, J.E., Beaty, H.N., 1982.** Legionnaires' pneumonia after aerosol exposure in guinea pigs and rats. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126(6), 1050-1057.
- Dawes, E.A., 1985.** Growth and survival of bacteria. In J. S. Poindexter and E.R. Leadbetter (eds). *Bacteria in nature*, vol 3. Plenum Press, Inc., New York, N.Y. p67-187.
- Declerck, P., Behets, J., De Keersmaecker, B., Ollivier, F., 2007.** Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *J. Appl. Microbiol.* 130, 2697-2703.
- Dedicoat, M., Venkatesan, P., 1999.** The treatment of Legionnaires' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 747-52.
- Delamare, J., 2000.** Dictionnaire des termes en médecine, 26^{ème} édition, Maloine (ed), p991.
- Dennis, P.J., Lee, J.V., 1988.** Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J. Appl. Bacteriol.* 65(2), 135-141.
- Dennis, P.J., Wright, A.E., Rutter, D.A., Death, J.E., Jones, B.P.C., 1984.** *Legionella pneumophila* in aerosols from shower baths. *J. Hyg.* 93(2), 349-353.
- Devos, L., Clymans, K., Boon, N., Verstraete, W., 2005.** Evaluation of nested PCR assays for the detection of *Legionella pneumophila* in a wide range of aquatic samples. *J. Appl. Microbiol.* 99, 916-925.
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J., Steiner, M., 2001.** Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect. Immun.* 69 (4), 2116-22.
- Direction Générale de la Santé (2005).** Circulaire DGS/SD5C/SD7A/DESUS/2005/323 du 11 juillet 2005 relative à la diffusion du guide d'investigation et d'aide à la gestion d'un ou plusieurs cas de légionellose.
- Direction Générale de la Santé (2003).** Circulaire DGS/SD7A-DHOS/E4-DPPR/SEI n° 2003/306 du 26 juin 2003, relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les tours aérofrigorifères des établissements de santé.
- Direction Générale de la Santé (2002).** Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243 du 22 avril 2002, relative à la prévention du risque légionelles dans les établissements de santé.

Direction Générale de la Santé (2000). Circulaire DGS/VS4/2000/336 du 19 juin 2000 et ses annexes, relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements de thermaux.

Direction Générale de la Santé (1998). Circulaire DGS/VS4 n°98/771 du 31 décembre 1998, relative à la mise en oeuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque liés aux légionelles dans les installations à risque et dans celles des bâtiments recevant du public.

Direction Générale de la Santé (1997). Circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose.

Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J., Jarraud, S., 2004. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. J. Clin. Microbiol. 42(1), 458-460.

Donlan, R.M., 2001. Biofilm and device-associated infections. Emerg. Infect. Dis. 7(2), 277-281.

Druett, H.A., Henderson, D.W., Packman, L., Peacock, S., 1953. Studies on respiratory infection. 1. The influence of particule size on particle size on respiratory infection with anthrax spores. J. Hyg. 51, 359-371.

Dutka, B.J., 1984. Sensitivity of *Legionella pneumophila* to sunlight in fresh and marine waters. Appl. Environ. Microbiol. 48(5), 970-974.

Edstrom industrie, 2003. Forms of chlorine in water, www.edstrom.com, consulté en novembre 2009.

Engleberg, N.C., Carter, C., Demarsh, P., Drutz, D.J., Eisenstein, B.I., 1986. A *Legionella*-specific DNA probe detects organisms in lung tissue homogenates from intranasally inoculated mice. Isr. J. Med. Sci. 22 (10), 703-5.

Etienne, J., Jarraud, S., 2008. Centre National de Référence des légionelles, Bilan annuel d'activité, <http://dm3.univ-lyon1.fr/>.

Ezzedine, H., Van Ossel, C., Delmee, M., Wauters, G., 1989. *Legionella* spp. In a hospital water system : Effect of control measures. J. Hosp. Infect. 13, 121-131.

Farhat, M., Trouilhé, M.C., Briand, E., Moletta-Denat, M., Robine, E., Frère, J., 2009. Development of a pilot-sacle 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network : heat shock treatment evaluation. J. Appl. Mibrobiol. [Epub ahead of print].

Fedorak, P.M., Westlake, W.S., 1978. Effect of sunlight on bacterial survival in transparent air samplers. Can. J. Microbiol. 24(5), 618-619.

Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C., Baine, W.B., 1979. Charcoal-yeast extract agar : primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 10(4), 437-441.

- Fenstersheib, M.D., Miller, M., Diggins, C., Liska, S., Detwiler, L., Werner, S.B., Lindquist, D., Thacker, W.L., Benson, R.F., 1990.** Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. Lancet. 336, 35-37.
- Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002.** *Legionella* and Legionnaires' disease : 25 years of investigation. Clin. Microbiol. 15 (3), 506-526.
- Fields, B.S., Haupt, T., Davis, J.P., Arduino, M.J., Miller, P.H., Butler, J.C., 2001.** Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa : possible role of bacterial endotoxin. J. Infect. Dis. 184(10), 1289-1292.
- Fields, B.S., 1996.** The molecular ecology of *legionellae*. Trends Microbiol. 4 (7), 286-90. Review.
- Fields, B.S., Shotts, E.B., Feeley, J.C., Gorman, G.W., Martin, W.T., 1984.** Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Appl. Environ. Microbiol. 47, 467-471.
- Finnerty, W.R., Makula, R.A., Felley, J.C., 1979.** Cellular lipids of the legionnaires' disease bacterium. Ann. Intern. Med. 90, 631-634.
- Fischer-Hoch, S.P., Bartlett, C.L., Tobin, J.O., Gillett, M.B., Nelson, A.M., Pritchard, J.E., 1981.** Investigation and control of an outbreak of legionnaires' disease in a district general. Lancet. 1, 932-6.
- Fitzgeorge, R.B., Baskerville, A., Broster, M., Hambleton, P., Dennis, P.J., 1983.** Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence : comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection. J. Hyg. 90, 81-89.
- Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., Pope, D.H., 1981.** Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 41 (1), 9-16.
- Fox, K.F., Brown, A., 1993.** Properties of the genus *Tatlockia*. Differentiation of *Tatlockia* (*Legionella*) *maceachernii* and *micdadei* from each other and from other legionellae. Can. J. Microbiol. 39 (5), 486-91.
- François-Devos, G., Toublanc, B., Laurans, G., Douadi, Y., Brunin, G., Jounieaux, V., 2003.** Apport de l'antigène soluble urinaire dans la prise en charge des légionelloses. Revue des Maladies Respiratoires. 20, 18.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beechman, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Malison, G.F., Marin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C., Brachman, P.S., 1977.** Legionnaires' disease : description of endemic pneumonia. N. Engl. J. Med. 297(22), 1189-1197.
- Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C., 2000.** Précis de bactériologie Clinique, Edition ESKA, Lavis, Italie. p1691.
- Friedman, S., Spitalny, K., Barbaree, J., Faur, Y., McKinney, R., 1987.** Pontiac Fever Outbreak Associated with a Cooling Tower. Am. J. Public Health. 77(5), 568-572.

- Fry, N.K., Alexiou-Daniel, S., Bangsberg, J.M., Bernader, S., Castellani-Pastoris, M., Etienne, J., Forsblom, B., Gaia, V., Helbig, J.H., Lindsay, D., Lück, P.C., Pelaz, C., Uldum, S.A., Harrison, T.G., 1999.** A multicenter evaluation of genotyping methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: Results from a pan-European study. Clin. Microbiol. Infect. 5, 462-477.
- Fry, N.K., Rowbotham, T.J., Saunders, N.A., Embley, T.M., 1991.** Direct amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amoebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia. FEMS Microbiol. Lett. 77 (5), 568-572.
- Fuxelius, H.H., Darby, A., Min, C.K., Cho, N.H., Anderson, S.G., 2007.** The genomic and metabolic diversity of *Rickettsia*. Res. Microbiol. 158, 745-753.
- Gabay, J.E., Horwitz, M.A., 1985.** Isolation and characterization of the cytoplasmic and outer membranes of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*). J. Exp. Med. 161 (2), 409-22.
- Gao, L.Y., Abu Kwaik, Y., 1999.** Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stage of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. Infect. Immun. 67, 862-870.
- Gao, L.Y., Harb, O.S., Abu Kwaik, Y., 1997.** Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. Infect. Immun. 65 (11), 4738-4746.
- Garcia, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., Abu Kwaik, Y., 2007.** *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. Environ. Microbiol. 9, 1267-1277.
- Garduño, R.A., Faulkner, G., Trevors, M.A., Vats, N., Hoffman, P.S., 1998.** Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol. 180 (3), 505-13.
- Garrity, G.M., Brown, A., Vickers, R.M., 1980.** *Tatlockia* and *Fluoribacter*: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. Int. Syst. Bacteriol. 30 (4), 609-614.
- Glick, T.H., Green, M.B., Breman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., Kassoff, I., 1978.** An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. Am. J. Epidemiol. 107(2), 149-160.
- Goetz, A.M., Stout, J.E., Jacobs, S.L., Fisher, M.A., Ponzer, R.E., Drenning, S., Yu, V.L., 1998.** Nosocomial legionnaires' disease discovered in community hospitals following cultures of the water system: seek and ye shall find. Am. J. Infect. Control. 26(1), 8-11.
- Goff, G.D., Splendlove, J.C., Adams, A.P., Nicholes, P.S., 1973.** Emission of microbial aerosols from sewage treatment plants that use trickling filters. Health Serv. Rep. 88(7), 640-652.
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Buchrieser, C., 2009.** *Legionella pneumophila*: population genetic, phylogeny and genomics. Infect. Genet. Evol. 9(5): 727-39.

- Götz, H.M., Tegnell, A., De Jong, B., Broholm, K.A., Kuusi, M., Kallings, I., Ekdahl, K., 2001.** A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden. *Epidemiol. Infect.* 126(2), 241-247.
- Graman, P., Quinlan, G., Rank, J., 1997.** Nosocomial legionellosis traced to a contaminated ice machine. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 18, 637-640.
- Green, P.N., 1993.** Efficacy of biocides on laboratory-generated *Legionella* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 158-161.
- Green, P.N., Pirrie, R.S., 1993.** A laboratory apparatus for generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 388-393.
- Green, H.L., Lane, W.R. (eds), 1957.** Introduction in particle clouds : dusts, smokes and mists. Their physics and physical chemistry and industrial and environmental aspects. Ch. 1. London : A & A.F. Spon. p3-7.
- Greub, G., Raoult, D., 2004.** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol.* 17(2), 413-433.
- Greub, G., Raoult, D., 2003.** Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmannella vermiformis*. *Res. Microbiol.* 154:619-621.
- Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., Niederhausern, S., Borella, P., Messi, P., 2008.** Effect of bacterial interface on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Curr. Microbiol.* 57, 532-536.
- Ha, T.L., 2005.** Etude de l'aérosol de *Legionella pneumophila*, Thèse de Sciences, Université Paris 12, p145.
- Habicht, W., Muller, H.E., 1988.** Occurrence and parameters of frequency of *Legionella* in warm water systems of hospitals and hotels in Lower Saxony. *Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene* 186(1), 79-88.
- Hales, L.M., Shuman, H.A., 1999.** *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect. Immun.* 67, 3662-3666.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2005.** Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 13(1), 7-10.
- Hambleton, P., Broster, M.G., Dennis, P.J., Henstridge, R., Fitzgeorge, R., Conlan, J.W., 1983.** Survival of virulent *Legionella pneumophila* in aerosols. *J. Hyg. (Lond).* 90(3), 451-460.
- Hambleton, P., Baskerville, A., Fitzgeorge, R.B., Bailey, N.E., 1982.** Pathological and biochemical features of *Legionella pneumophila* infection in guinea pigs. *J. Med. Microbiol.* 15, 317-326.
- Hamilton, E., Seal, D.V., Hay, J., 1996.** Comparison of chlorine dioxide disinfection for control of *Legionella* in a hospital potable water supply. *J. Hosp. Infect.* 32(2), 156-60.

- Harb, O.S., Gao, L.Y., Abu Kwaik, Y., 2000.** From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ. Microbiol.* 2 (3), 251-65. Review.
- Harper, G.J., Morton, J.D., 1953.** The respiratory retention of bacterial aerosols. Experiments with radioactive spores. *J. Hyg.* 51, 372-385.
- Harrison, T.G., Doshi, N., Fry, N.K., Joseph, C.A., 2007.** Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 78-85.
- Héchar, Y., Ferraz, S., Bruneteau, E., Steinert, M., Berjeaud, J.M., 2005.** Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 19-23.
- Hedges, L.J., Roser, D.J., 1991.** Incidence of *Legionella* in the urban environmental in Australia. *Wat. Res.* 25(4), 393-399.
- Heller, R., Holler, C., Sussmuth, R., Gundermann, K.O., 1998.** Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26(1), 64-68.
- Heng, B.H., Goh, K.T., Ng, D.L.K., Ling, A.E., 1997.** Surveillance of Legionellosis and *Legionella* Bacteria in the Built Environment in Singapore. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 26(5), 557-565.
- Hess, G.E., 1965.** Effects of oxygen on aerosolized *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol.* 13(5), 781-787.
- Heuner, K., Swanson, M., (eds), 2008.** *Legionella* : molecular microbiology. Illustrated edition. p249.
- Heuner, K., Bender-Beck, L., Brand, B.C., Lück, P.C., Mann, K.H., Marre, R., Ott, M., Hacker, J., 1995.** Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect. Immun.* 63(7) : 2499-507.
- Higa, F., Edelstein, P.H., 2001.** Potential virulence role of *Legionella pneumophila ptsP* ortholog. *Infect. Immun.* 69, 603-617.
- High, A.S., Torosian, S.D., Rodgers, F.G., 1993.** Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a gene (*ompM*) encoding a 25 kDa major outer-membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila*. *J. Gen. Microbiol.* 139 (8), 1715-21.
- Hindahl, M.S., Iglewski, B.H., 1984.** Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. *J. Bacteriol.* 159 (1), 107-13.
- Hlady, W.G., Millen, R.C., Mintz, C.S., Shelton, B.C., Hopkins, R.S., Daikos, G.L., 1993.** Outbreak of Legionnaires' disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology. *Am. J. Epidemiol.* 138(8), 555-562.

- Hoffman, P.S., Seyer, J.H., Butler, C.A., 1992.** Molecular characterization of the 28- and 31-kilodaltons subunits of the *Legionella pneumophila* major outer membrane protein. J. Bacteriol. 174, 908-913.
- Horwitz, M.A., 1984.** Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. Cell. 36 (1), 27-33.
- Hossain, M.S., Hoque, M.M., 1994.** Isolation of *Legionella pneumophila* from chlorinated water and water from industrial cooling tower. Banglad. J. Microbiol. 11(2), 111-114.
- Hughes, M.S., Stelle, T.W., 1994.** Occurrence and distribution of *Legionella* species in composted plant materials. Appl. Environ. Microbiol. 60(6), 2003-2005.
- Huq, A., Rivera, I.N.G., Colwell, R.R. 2003.** Epidemiological significance of viable but non culturable microorganisms. In Nonculturable microorganisms in the environment, Colwell, R.R., Grimes, D.J. (Eds), ASM Press ; Washington, DC. 301-323.
- Husmann, L.K., Johnson, W., 1992.** Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors. Infect. Immun. 60 (12), 5212-8.
- Hussong, D., Colwell, R.R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A.D., Weiner, R.M., Burge, W.D., 1987.** Viable *Legionella pneumophila* not detected by culture on agar media. Biotechnology. 5, 947-950.
- Ishimatsu, S., Miyamoto, H., Hori, H., Tanaka, I., Yoshida, S., 2001.** Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower. Ann. Occup. Hyg. 45(6) : 421-7.
- Israeli, E., Gitelman, J., Lighthart, B., 1994.** Death mechanisms in microbial bioaerosols with special reference to the freeze-dried analog, In Lighthart B. and Mohr A.J. (eds), Atmospheric microbial aerosols, theory and applications. Chapman and Hall, Inc., New York. p167-191.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Fitzgeorge, R.B., Dennis, P.J., Keevil, C.W., 1995.** Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 63(11), 4224-4230.
- Jarraud, S., Freney, J. (Eds), 2006.** *Legionella*, Editions TEC & DOC, 198p.
- Jarraud, S., Reyrolle, M., Etienne, J., 2000.** *Legionella* et Légionellose. In Précis de bactériologie clinique, ESKA Editor, 1389-1405.
- Jauhac, B., Nowicki, M., Prevost, G., Piemont, Y., Fleurette, J., Monteil, H., 1992.** Detection of *Legionella spp.* In bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 30(4), 920-924.
- Jepras, R.I., Fitzgeorge, R.B., Baskerville, A., 1985.** A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. J. Hyg. (Lond). 95(1), 29-38.

- Jernigan, D.B., Hofmann, J., Cetron, M.S., Genese, C.A., Nuorti, J.P., Fields, B.S., Benson, R.F., Carter, R.J., Edelstein, P.H., Guerrero, I.C., Paul, S.M., Lipman, H.B., Breiman, R., 1996.** Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet*. 347, 9000, 494-499.
- Joly, J.R., McKinney, R.M., Tobin, J.O., Bibb, W.F., Watking, I.D., Ramsay, D., 1986.** Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 23, 768-771.
- Jonas, D., Meyer, H.G., Matthes, P., Hartung, D., Jahn, B., Daschner, E.D., Jansen, B., 2000.** Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2284-2291.
- Karim, A., Ahmed, S., Rossoff, L.J., 2002.** Legionnaires' disease associated with acute encephalitis and arrhythmia. *Crit. Care Med.* 30, 1028-1029.
- Katz, S.M., Hammel, J.M., 1987.** The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 17(3), 150-6.
- Katz, S.M., Habib, W.A., Hammel, J.M., Nash, P., 1982.** Lack of airborne spread of infection by *Legionella pneumophila* among guinea pigs. *Infect. Immun.* 38(2), 620-622.
- Kaufmann, A.F., McDade, J.E., Patton, C.M., Bennett, J.V., Skaliy, P., Feeley, J.C., Anderson, D.C., Potter, M.E., Newhouse, V.F., Gregg, M.B., Brachman, P.S., 1981.** Pontiac fever : isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am. J. Epidemiol.* 114(3), 337-47.
- Kholer, R., Fanghanel, J., Konig, B., Luneberg, E., Frosch, M., Rahfeld, J.U., Hilgenfeld, R., Fischer, G., Hacker, J., Steiner, M., 2003.** Biochemical and functional analyses of the Mip protein : influence of the N-terminal half and of peptidylpropyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 71, 4389-4397.
- Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., Kendall, A.M., 2002.** Litterature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res.* 36, 4433-44
- Kirby, J.E., Isberg, R.R., 1998.** Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. *Trends Microbiol.* 6 (7), 256-8. Review.
- Kilvington, S., Price, J., 1990.** Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 519-525.
- Kliment, V., 1973.** Similarity and dimensional analysis, evaluation of aerosol deposition in the lungs of laboratory animals and mans. *Folia Morphol.* 21(1), 59-64.
- Knirel, Y.A., Rietschel, E.T., Marre, R., Zähringer, U., 1994.** The structure of the O-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 221 (1), 239-45.
- Koide, M., Furugen, M., Haranaga, S., Higa, F., Tateyama, M., Yamane, N., Fujita, J., 2008.** *Jpn. J. Infect. Dis.* 61(6), 487-489.

- Koide, M., Arakaki, N., Saito, A., 2001.** Distribution of *Legionella longbeachae* and other legionella in Japanese potting soils. *J. Infect. Chemother.* 7(4), 224-227.
- Koide, M., Saito, A., Okazaki, M., Umeda, B., Benson, R.F., 1999.** Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting soils in Japan. *Clin. Infect. Dis.* 29(4), 943-944.
- Kramer, M.J., Ford, T.E., 1994.** Legionellosis : ecological factors of an environmentally “New” disease, *Zbl. Hyg.* 195, 470-482.
- Krinos, C., High, A.S., Rodgers, F.G., 1999.** Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J. Appl. Microbiol.* 86, 237-244.
- Kuchta, J.M., Navratil, J.N., Shepherd, M.E., Wadowsky, R.M., Dowling, J.N., States, S.J., Yee, R., 1993.** Impact of chlorine and heat on the survival of *Hartmannella vermiformis* and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(12), 4096-4100.
- Lambert, M.A., Moss, C.W., 1989.** Cellular fatty acid composition and isoprenoid quinone contents of 23, *Legionella* species. *J. Clin. Microbiol.* 27(3), 465-473.
- Lammertyn, E., Anné, J., 2004.** Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 238(2) : 273-9.
- La Scola, B., Birtles, R.J., Greub, G., Harrison, T.J., Ratcliff, R.M., Raoult, D., 2004.** *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 : 699-703.
- Lee, T.C., Stout, J.E., Yu, V.L., 1988.** Factors predisposing to *Legionella pneumophila* colonization in residential water systems. *Arch. Environ. Health.* 43(1), 59-62.
- Lejeune, P., 2003.** Contamination of abiotic surfaces : what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol.* 11(4), 179-184.
- Leluc, O., Doucet, V., Petit, P., Thuret, I., Devred, P., 2000.** *Legionella pneumophila* : unusual lung and hepatic manifestations. *J. Radiol.* 81, 241-242.
- Lema, M.W., Brown, A., 1995.** *Legionella pneumophila* has two 60-kilodalton heat-shock proteins. *Curr. Microbiol.* 31 (6), 332-5.
- Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P.P., Sacchetti, R., Stampi, S., Zanetti, F., 2005.** *Legionella* waterline colonization : detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *J. Appl. Microbiol.* 98 (2), 373-9.
- Lieberman, R.J., Shadix, L.C., Newport, B.S., Crout, S.R., Buescher, S.E., Safferman, R.S., Stetler, R.E., Lye, D., Shay Fout, G., Dahling, D.R., 1994.** Source water microbial quality of some vulnerable public ground water supplies. *Proceedings Water Quality Technology Conference, Part II.* 1425-1436.
- Lin, Y.E., Stout, J.E., Yu, Y.L., Vidic, R.D., 1998.** Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Seminars in Respiratory Infections.* 13(2) : 147-159.

- Lück, P.C., Wenchel, H.M., Helbig, J.H., 1998.** Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1160-1163.
- Luneberg, E., Zahringer, U., Knirel, Y.A., Steinmann, D., Hartmann, M., Steinmetz, I., Rohde, M., Kohl, J., Frosch, M., 1998.** Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 188, 49-60.
- MacDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., Dowdle, W.R., 1977.** Legionnaire's disease : isolation of a bacterium and demonstration of its role in the other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 297 : 1197-1203.
- MacDonell, M.T., Colwell, R.R., 1987.** The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucl. Acids Res.* 15, 1335.
- MacDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D., Kjelleberg, S., 1998.** Nonculturability : adaptation or debilitation ? *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 1-9.
- MacNealy, T., Newsome, A., Johnson, R., Berk, S., 2002.** Impact of amoebae, bacteria, and *Tetrahymena* on *Legionella pneumophila* multiplication and distribution in an aquatic environment. In *legionella* : Proceedings of the Fifth International Symposium, Mare, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., Luck, P.C. (eds), Washington, DC : American Society for Microbiology Press. p170-175.
- Mahoney, J.F., Hoge, C.W., Farley, T.A., Barbaree, J.M., Breiman, R.F., Benson, R.F., McFarland, L.M., 1992.** Community wide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine. *J. Infect. Dis.* 165(4), 736-739.
- Makin, T., 1986.** Inhibition of *Legionella* by other organisms. *Med. Lab. Sci.* 43 : 854.
- Malan, A.K., Martins, T.B., Jaskowski, T.D., Hill, H.R., Litwin, C.M., 2003.** Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. *J. Clin. Microbiol.* 41(7), 3060-3063.
- Mangione, E.J., Remis, R.S., Tait, K.A., McGee, H.B., Gorman, G.W., Wentworth, B.B., Baron, P.A., Hightower, A.W., Barbaree, J.M., Broome, C.V., 1985.** An outbreak of Pontiac fever related to whirlpool use, Michigan. *JAMA.* 253(4), 535-539.
- Marmet, D., Borstein, N., Fleurette, J., 1988.** Identification des *Legionella* par analyse des acides gras en chromatographie phase gazeuse (CPG) et des ubiquinones en chromatographie liquide haute performance (CLHP). *Ann. Biol. Clin.* 46, 371-375.
- Marra, A., Blander, S.J., Horwitz, M.A., Shuman, H.A., 1992.** Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 9607-9611.
- Marston, B.J., Lipman, H.B., Breiman, R.F., 1994.** Surveillance for Legionnaires' disease. *Arch. Intern. Med.* 154, 2417-2422.

- Mathieu, L., Robine, E., Deloge-Abarkan, M., Ritoux, S., Pauly, D., Hartemann, P., Zmirou-Navier, D., 2006.** *Legionella* Bacteria in Aerosols : Sampling and Analytical Used during the Legionnaires Disease Outbreak in Pas-de-Calais. *J. Infect. Dis.* 193(9), 1333-1335.
- Mauchline, W.S., James, B.W., Fitzgeorge, R.B., Dennis, P.J., Keevil, C.W., 1994.** Growth temperature reversibly modulates the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 62(7), 2995-2997.
- Meenhorst, P.L., Reingold, A.L., Gorman, G.W., Feeley, J.C., Van Cronenburg, B.J., Meyer, C.L., Van Furth, R., 1983.** *Legionella pneumophila* in guinea pigs exposed to aerosols of concentrated potable water from a hospital with Legionnaires' disease. *J. Infect. Dis.* 147(1), 129-132.
- Miyamoto, H., Yoshida, S., Taniguchi, H., Shuman, H.A., 2003.** Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of chromosomal DNA. *J. Bacteriol.* 185, 6712-6718.
- Mody, C.H., Paine, R., Shahrabadi, M.S., Simon, R.H., Pearlman, E., Eisenstein, B.I., Toews, G.B., 1993.** *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 167(5), 1138-1145.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Abu Kwaik, Y., 2005.** Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 71 (1), 20-8. Review.
- Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L., Kwaik, Y.A., 2004.** 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.* 72(7), 4040-51.
- Molmeret, M., 2001.** Replication intracellulaire de *Legionella pneumophila* : des amibes aux macrophages. PhD Thesis. Université Claude Bernard-Lyon1, Lyon, France.
- Molofsky, A.B., Swanson, M.S., 2004.** Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol. Microbiol.* 53 (1), 29-40.
- Montanaro-Punzengruber, J.C., Hicks, L., Meyer, W., Gilbert, G.L., 1999.** Australian isolates of *Legionella longbeachae* are not a clonal population. *J. Clin. Microbiol.* 37(10), 3249-3254.
- Morita, R.Y., 1997.** Bacteria in oligotrophic environment. Chapman Hall, New York.
- Morris, G.K., Patton, C.M., Feeley, J.C., Johnson, S.E., Gorman, G., Martin, W.T., Skaliy, P., Mallison, G.F., Politi, B.D., Mackel, D.C., 1979.** Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples. *Ann. Intern. Med.* 90, 664-666.
- Mouchtouri, V., Velonakis, E., Hadjichristodoulou, C., 2007.** Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. *Am. J. Infect. Control.* 35(9), 623-7.
- Muder, R.R., Yu, V.L., 2002.** Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin. Infect. Dis.* 35, 990-998.

- Muller, D., Edwards, M.L., Smith, D.W., 1983.** Changes in iron and transferrin levels and body temperature in experimental airborne legionellosis. *J. Infect. Dis.* 147(2), 302-307.
- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., Donlan, R.M., 2001.** Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology.* 147(11), 3121-3126.
- Nahapetian, K., Beurtin, D., Dubrou, S., Gounon, P., Squinazi, F., 1991.** The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems. *Res. Microbiol.* 142, 677-685.
- Neumeister, B., Reiff, G., Faigle, M., Dietz, K., Northoff, H., Lang, F., 2000.** Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 914-919.
- Nhu Nguyen, T.M., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J., Desenclos, J.C., 2006.** A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers – how far can contaminated aerosols spread ? *J. I. D.* 193, 102-111.
- Nowicki, M., Paucod, J.C., Bornstein, N., Isoard, P., Fleurette, J., 1988.** Efficacy of spiramycin on experimental airborne legionellosis in guinea pigs. *J. Antimicrob. Chem.* 22(supl B), 63-68.
- O'Brien, S.J., Bhopal, R.S., 1993.** Legionnaires' disease : the infective dose paradox. *Lancet.* 342, 5-6.
- Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., 2004.** Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp. *Water Res.* 2757-2763.
- Ohno, A., Kato, N., Yamada, K., Yamaguchi, K., 2003.** Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2540-2547.
- Ortiz-Roque, C.M., Hazen, T.C., 1987.** Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(9), 2231-2236.
- Ott, M., Messner, P., Heesemann, J., Marre, R., Hacker, J., 1991.** Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J. Gen. Microbiol.* 137(8) : 1955-61.
- Palm, P.E., Mc Nerney, J.M., Hatch, T., 1956.** Respiratory dust retention in small animals ; a comparison with man. *AMA Arch. Ind. Health.* 13(4), 355-365.
- Palmer, C.J., Bonilla, G.F., Roll, B., Paszko-Kolva, C., Sangemano, L.R., Fujioka, R.S., 1995.** Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the EnviroAmp *Legionella* PCR Kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2), 407-412.
- Palmer, C.J., Tsai, Y.L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C., Sangemano, L.R., 1993.** Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(11), 3618-3624.

- Pan, T.M., Yea, H.L., Huang, H.C., Lee, C.L., Horng, C.B., 1996.** *Legionella pneumophila* infection in Taiwan : A preliminary report. J. Formos. Med. Assoc. 95(7), 536-539.
- Paszko-Kolva, C. M., Shahamat, M., Colwell, R.R., 1992.** Long-term survival of *Legionella pneumophila* serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. FEMS microbiology ecology. 102, 45-55.
- Patton, C.M., Johnson, S.R., Kaufmann, A.F., 1979.** Susceptibility of laboratory rodents, birds, and the rabbit to *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease bacterium). Presented at the Annual Meeting of the American Society of Microbiology, 1979. Paper number 879.
- Payne, N.R., Horwitz, M.A., 1987.** Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. J. Exp. Med. 166 (5), 1377-89.
- Pecharman, F., 2002.** Gestion du risqué lié aux légionelles, Mémoire de l'Ecole Nationale de la Santé Publique. 72p.
- Perola, O., Kauppinen, J., Kusnetsov, J., Kärkkäinen, U.M., Lück, P.C., Katila, M.L., 2005.** Persistent *Legionella pneumophila* colonization of a hospital water supply : efficacy of control methods and a molecular epidemiological analysis. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. A. 113, 45-53.
- Philip, P., Taillard, J., Moore, N., Delord, S., Valtat, C., Sagaspe, P., Bioulac, B., 2006.** The effect of coffee and napping on nighttime highway driving : a randomized trial. Ann. Intern. Med. 144(11), 785-791.
- Plan gouvernemental de prévention de la maladie du légionnaire du 7 juin 2004,** fiche mise à jour le 15/06/08
- Plouffe, J.F., Breiman, R.F., Fields, B.S., Herbert, M., Inverso, J., Knirsch, C., 2003.** Azithromycin in the treatment of *Legionella pneumophila* requiring hospitalization. Clin. Infect. Dis. 37, 1475-80.
- Plouffe, J.F., Webster, L.R., Hackman, B., 1983.** Relationship between colonization of hospital buildings with *Legionella pneumophila* and hot water temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 46(3), 769-770.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D., 1999.** Microbiologie, De Boeck Université, 3ème tirage. p406.
- Ribeiro, C.D., Burge, S.H., Palmer, S.R., Tobin, J.O., Watkins, I.D., 1987.** *Legionella pneumophila* in a hospital water system following a nosocomial outbreak : prevalence, monoclonal antibody subgrouping and effect of control measures. Epidem. Inf. 98, 253-262.
- Richardson, I.R., 1990.** The incidence of *Bdellovibrio spp.* In man-made water systems : coexistence with légionelles. J. Appl. Bacteriol. 69, 134-140.
- Riffard, S., Douglass, S., Brooks, T., Springthorpe, S., Fillion, L.G., Sattar, S.A., 2001.** Occurrence of *Legionella* in groundwater : an ecological study, Water Sci. Technol. 43(12), 99-102.

- Rivals, A., 1997.** Pneumopathies à *Legionella* : a propos de 67 observations. Revue générale de la littérature, Thèse de sciences. Université de Toulouse.
- Rodgers, F.G., Greaves, P.W., Macrae, A.D., Lewis, M.J., 1980.** Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. J. Clin. Pathol. 33 (12), 1184-8.
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V., Keevil, C.W., 1994.** Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl. Environ. Microbiol. 60(5), 1585-1592.
- Rossier, O., Cianciotto, N.P., 2001.** Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitates intracellular infection by *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 69, 2092-2098.
- Rowbotham, T.J., 1986.** Current views on the relationships between *amoebae*, *legionellae* and man. Isr. J. Med. Sci. 22, 678-689.
- Rowbotham, T.J., 1983.** Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoeba, and the interaction of those and other isolates with amoebae. J. Clin. Pathol. 36, 978-986.
- Rowbotham, T.J., 1980.** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin., Pathol. 33, 1179-1183.
- Ruf, B., Schurmann, D., Horbach, I., Fehrenbach, F.J., Pohle, H.D., 1990.** Prevalence and diagnosis of *Legionella pneumophila* : a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. J. Infect. Dis. 162(6), 1341-1348.
- Sadosky, A.B., Wiater, L.A., Shuman, H.A., 1993.** Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. Infect. Immun. 61, 5361-5373.
- Saenz, H.L., Engel, P., Stoeckli, M.C., Lanz, C., Raddatz, G., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R., Schuster, S.C., Dehio, C., 2007.** Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion system as host adaptability factors. Nat. Genet. 39, 1469-1476.
- Segal, G., Shuman, H.A., 2002.** Genetic analysis of *Legionella pneumophila* intracellular multiplication in human and protozoan hosts. In *Legionella : Proceedings of the Fifth International Symposium* ed. Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J., Lück, P.C., Washington, DC : American Society for Microbiology Press.
- Segal, G., Shuman, H.A., 1999a.** *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. Infect. Immun. 67, 2117-2124.
- Segal, G., Russo, J.J., Shuman, H.A., 1999b.** Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. Mol. Microbiol. 34, 799-809.
- Simon, L., Majo, D.I., Honnart, V., Hartemann, P., 2006.** RRESO du 19 janvier 2006. <http://plombiers.reunis.free.fr/Documentations/desenfectionlegionelose.pdf>, consulté en novembre 2009.

- Sire, S., Staub, T., Christmann, D., 1994.** Manifestations extrapulmonaires des légionelloses. *Medecine et maladies infectieuses* 24, 874-880.
- Smith-Somerville, H.E., Huryn, V.B., Walker, C., Winters, A.L., 1991.** Survival of *Legionella pneumophila* in the cold-water ciliate *Tetrahymena vorax*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2742-2749.
- Solomon, J.M., Rupper, A., Cardelli, J.A., Isberg, R.R., 2000.** Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68, 2939-2947.
- States, S.J., Conley, L.F., Kuchta, J.M., Oleck, B.M., Wolford, R.S., Wadowsky, R.M., McNamara, A.M., Sykora, J.L., Keleti, G., Yee, R.B., 1987.** Survival and multiplication of *Legionella pneumophila* in municipal Drinking Water Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(5), 976-986.
- States, S.J., Conley, L.F., Ceraso, M., Stephenson, T.E., Wolford, R.S., Wadowsky, R.M., McNamara, A.M., Yee, R.B., 1985.** Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(5), 1149-54.
- Steele, T.W., McLennan, A.M., 1996.** Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1081-1083.
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., Glöckner, G., 2007.** *Legionella* pathogenicity : genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int. J. Med. Microbiol.* 297(7-8), 577-587.
- Steinert, M., Hentschel, U., Hacker, J., 2002.** *Legionella pneumophila* : an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 149-162.
- Steinert, M., Flugel, M., Schuppler, M., Helbig, J.H., Supriyono, A., Proksch, P., Luck, P.C., 2001.** The Lly protein is essential for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 41-47.
- Steinert, M., Emody, L., Amann, R., Hacker, J., 1997.** Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2047-2053.
- Stelle T., Lanser, J., Sangster, N., 1990a.** Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1), 49-53.
- Stelle, T., Moore, C.V., Sangster, N., 1990b.** Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *Legionella* in potting soils in Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10), 2984-2988.
- Stewart, C.R., Rossier, O., Cianciotto, N.P., 2009.** Surface translocation by *Legionella pneumophila* : a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J. Bacteriol.* 191(5), 1537-1546.

- Stone, B.J., Abu Kwaik, Y., 1998.** Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* 66 (4), 1768-75.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002.** Biofilm as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
- Stout, J.E., Yu, V.L., 1997.** Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* 337(10), 682-687.
- Stout, J.E., Yu, V.L., Yee, Y.C., Vaccarello, S., Diven, W., Lee, T.C., 1992.** *Legionella pneumophila* in residential water supplies : environmental surveillance with clinical assessment for Legionnaires' disease. *Epidemiol. Infect.* 109(1), 49-57.
- Stout, J.E., Yu, V.L., Best, M.G., 1985.** Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 221-228.
- Swanson, M.S., Hammer, B.K., 2000.** *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 567-613. Review.
- Swanson, M.S., Isberg, R.R., 1993.** Formation of the *Legionella pneumophila* replicative phagosome. *Infect. Agents. Dis.* 2 (4), 224-6.
- Tangwacharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P., Griffiths, M.W., 2006.** Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. *J. Food Prot.* 69, 2747-2753.
- Tatlock, H., 1944.** A Rickettsia-like organism recovered from guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 57 : 95-99.
- Taytard, A., 2007.** BPCO : épidémiologie, <http://www.respir.com/doc/abonne/pathologie/bronchite-chronique-bpco/BPCOEpidemiologie.asp>, mis à jour le 12/072007, consulté en novembre 2007.
- Temmerman, R., Vervaeren, H., Noseda, B., Boon, N., Verstraete, W., 2006.** Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4323-4328.
- Thomas, V., 2004.** Ecologie de *Legionella pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable, Thèse de sciences. Université Paris XI, p353.
- Thomason, B.M., Chandler, F.W., Hollis, D.G., 1979.** Flagella on Legionnaires' disease bacteria : an interim report. *Ann. Intern. Med.* 91(2), 224-226.
- Tison, D.L., Barros, J.A., Seidler, R.J., 1983.** *Legionella* in aquatic habitats in the Mount Saint Helen blast zone. *Curr. Microbiol.* 9, 345-348.
- Tison, D.L., Pope, D.H., Cherry, W.B., Fliermans, C.B., 1980.** Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (Cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* 39(2), 456-459.
- Thomson, N.R., Holden, M.T., Carder, C., 2008.** *Chlamydia trachomatis* : genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates. *Genome Res.* 18, 161-171.

- Tomov, A., Kassovsky, V., Chorbadijska, L., Tsvetkova, E., Tsanev, N., Vencheva, Z., 1982.** Lytic activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* against bacteria of the family *Legionellaceae*. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. A. 252-96-100.
- Toze, S., Sly, L.I., MacRae, I.C., Fuerst, J.A., 1990.** Inhibition of growth of *Legionella* species by heterotrophic plate count bacteria isolated from chlorinated drinking water. Curr. Microbiol. 21(2), 139-143.
- Tully, M., 1991.** A plasmid from a virulent strain of *Legionella pneumophila* is conjugative and confers resistance to ultraviolet light. FEMS Microbiol. Lett. 90(1), 43-48.
- Twisk-Meijssen, M.J.M., Meenhorst, P.L., van Cronenburg, B.J., Mulder, J.D., Scheffer, E., Van Furth, R., 1987.** The course of *Legionella pneumophila* in guinea pigs after inhalation of various quantities of *L. pneumophila*. Immunobiol. 176, 108-124.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2001.** *Legionella* : Drinking Water Health Advisory, Washington. p27.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1985.** *Legionella* : Human Health Criteria Document. Office of Science and Technology, Office of Water, Washington, DC 20460. 123p.
- Van der Kooij, D., Veenendaal, H.R., Scheffer, W.J., 2005.** Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. Water Res. 39(13), 2789-2798.
- Venkataraman, C., Haak, B.J., Bondada, S., Abu Kwaik, Y., 1997.** Identification of Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. J. Exp. Med. 186, 537-547.
- Vickers, R.M., Yu, V.L., Hanna, S.S., Muraca, P., Diven, W., Carmen, N., Taylor, F.B., 1987.** Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems : 15-hospital prospective study. Infect. Control. 8(9), 357-363.
- Wadowsky, R.M., Yee, R.B., 1985.** Effect of non *Legionellaceae* bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water. Appl., Environ. Microbiol. 49(5), 1206-1210.
- Wadowsky, R.M., Yee, R.B., 1983.** Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. Appl. Environ. Microbiol. 46, 1447-1449.
- Weaver, R.E., Feeley, J.C., 1979.** Cultural and biochemical characterisation of legionnaires disease bacterium. 'Legionnaires', the bacterium and methodology. Center for Disease Control, Atlanta GA. 19-25.
- Wieland, M.M., Faigle, M., Lang, F., Northoff, H., Neumeister, B., 2002.** Regulation of the *Legionella* mip-promotor during infection of human monocytes. FEMS Microbiol. Lett. 212, 127-132.

- Williams, M.M., Braun-Howland, E.B., 2003.** Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9), 5463-5471.
- Winn, W.C., 1988.** Legionnaires' disease : historical perspective. *Clin. Microbiol.* 1(1), 60-61.
- Winn, W.C. Jr., Davis, G.S., Gump, D.W., Craighead, J.E., Beaty, H.N., 1982.** Legionnaires' pneumonia after intratracheal inoculation of guinea pigs and rats. *Lab. Invest.* 47(6), 568-578.
- Witherell, L.E., Duncan, R.W., Stone, K.M., Stratton, L.J., Orciari, L., Kappel, S., Jillson, D.A., 1988.** Investigation of *Legionella pneumophila* in Drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 80(2), 87-93.
- Woo, A.H., Yu, V.L., Goetz, A., 1986.** Potential in-hospital modes of transmission of *Legionella pneumophila*. Demonstration experiments for dissemination by showers, humidifiers and rinsing of ventilation bag apparatus. *Am. J. Med.* 80, 567-573.
- Wullings, B.A., Van der Kooij, D., 2006.** Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. In drinking water treated at temperature below 15°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1), 157-166.
- Yamamoto, H., 2000.** Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-sporeforming bacteria, and its modeling. *J. Infect. Chemother.* 6, 112-114.
- Yamamoto, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., 1996.** Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 149-154.
- Yu, V.L., Greenberg, R.N., Zadeikis, N., Stout, J.E., Khashab, M.M., Olson, W.H., 2004.** Levofloxacin efficacy in the treatment of community acquired legionellosis. *Chest.* 125, 2135-9.
- Yu, V.L., 1993.** Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella* ? *Am. J. Med.* 95(1), 13-15.
- Zähringer, U., Knirel, Y.A., Lindner, B., Helbig, J.H., Sonesson, A., Marre, R., Rietschel E.T., 1995.** The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392, 113-39. Review.
- Zanetti, F., Stampi, S., De Luca, G., Fateh-Moghadam, P., Antonietta, M., Sabbatini, B., Checchi, L., 2000.** Water characteristics associated with the occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units. *Eur. J. Oral Sci.* 108(1), 22-8.
- Zuravleff, J.J., Yu, V.L., Shonnard, J.W., Rihis, J.D., Best, M., 1983.** *Legionella pneumophila* contamination of a hospital humidifier. Demonstration of aerosol transmission and subsequent subclinical infection in exposed guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128(4), 657-661.

Sites internet :

- <http://www.afssaps.fr>, consulté en novembre 2009,
http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/0857d69281070449420e6ddf48f04f94.pdf
- <http://cnr.univ-lyon1.fr/>, Diagnostic des légionelloses, http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR_legionelles/, consulté en novembre 2009.
- <http://dictybase.org/Multimedia/LarryBlanton/index.html>, Grimson et Blanton. Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University, consulté en octobre 2009.
- <http://www.ecosante.fr/>, consulté en novembre 2009,
<http://www.ecosante.fr/index2.php?base=FRAN&langh=FRA&langs=FRA>
- www.edstrom.com, consulté en novembre 2009.
- www.ewgli.org, consulté de septembre à décembre 2009.
- Guide de bonnes pratiques 2001: *Legionella* et tours aéroréfrigérantes, <http://www.sante.gouv.fr/hm/pointsur/legionellose/tours/leg.pdf>
- Guide pratique à l'usage des travailleurs sociaux, fiche pratique n°7, 2006. https://poitou-charentes.sante.gouv.fr/accueil/sante_habitat/docs/habitat_degrade/travail_sociaux_deux_sevres/fiche07_trav_soc_09_06.pdf, consulté en novembre 2009.
- <http://installationsclassees.ecologie.gouv.fr>
- www.invs.sante.fr, consulté de août à décembre 2009.
- www.invs.sante.fr, Epidémiologie des maladies à déclaration obligatoire en France, Situation en 1995 et tendances évolutives récentes, Infuso, A., Hubert, B., www.invs.sante.fr/bea/1995/do_p8.html, consulté en septembre 2009.
- www.invs.sante.fr, Epidémiologie des maladies à déclaration obligatoire en France, Les légionelloses en France en 1996, Decludt, B., Hubert, B., www.invs.sante.fr/bea/1996/do_p23.html, consulté en septembre 2009.
- <http://www.mgc.ac.cn>, consulté en octobre 2009.
- <http://www.rapidmicrobiology.com/news/1054h27.php>, consulté en novembre 2009.
- <http://www.afwa-hq.org/fr/glossaire.inc.php>, consulté en décembre 2009.

N° d'identification :

TITRE

LEGIONELLA ET LEGIONELLOSE : EVOLUTION DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES EN
FRANCE DE 1987 A 2008.

Thèse soutenue le : 28 janvier 2010

Par : Camille FANJEAUX

RESUME :

Legionella est une bactérie ubiquitaire dans les environnements hydriques. Elle est transmise via l'inhalation d'aérosols contaminés et peut être à l'origine d'une pneumonie sévère appelée maladie du légionnaire. L'urbanisation et les progrès technologiques ont donné l'opportunité à cette bactérie de se développer dans des installations hydriques artificielles (tours aérorefrigérantes, systèmes de climatisation, réseaux d'eau chaude, ...). Depuis 1987, la maladie du légionnaire fait l'objet d'une déclaration obligatoire auprès des autorités sanitaires françaises. En France, au cours des vingt dernières années, de nombreuses évolutions ont été observées concernant les données épidémiologiques recueillies par l'InVS. Parmi celles-ci, nous avons notamment noté des augmentations significatives de cas déclarés et de l'âge moyen des patients, ainsi qu'une baisse de la létalité pour cette pathologie. Malgré la multitude de facteurs déterminant ces évolutions, nous avons pu formuler des hypothèses pour tenter de les expliquer, telles que le renforcement du système de surveillance, une amélioration des techniques de diagnostic, une meilleure prise en charge des patients...

MOTS CLES :

Legionella, Maladie du légionnaire, Epidémiologie, Surveillance, Prévention.

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Gantzer Christophe	Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME)	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes :

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicaments
5 – Biologie

② – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation - Nutrition
6 – Pratique professionnelle