

## DEDICACES

*A mes parents, mes frères (Sara et Zakaria) et ma famille*

*A tous mes chers cousins et amis*

*A Mes chers professeurs*

*A toi*

*Tu sauras pourquoi...*

## REMERCIEMENTS

La thèse est une aventure scientifique riche en apprentissage, elle nécessite un travail de longue haleine, on peut la qualifier comme un défi que l'on se donne à soi-même. Mais à côté de ce travail acharné, la thèse est une formidable histoire de relations, de rencontres et d'amitié. La pratique de la recherche scientifique nous place souvent face à des questionnements intellectuels et des obstacles techniques. La solution, n'est peut-être jamais proposé par nos tabourets ! mais bien évidemment par le fruit de nombreux contacts que nous avons eu l'occasion de créer avec des scientifiques ou autres passionnés par leur projet de recherche. A l'issue de cette période de doctorat qui aura été probablement l'un des plus beaux chapitres de ma vie académique et aussi personnel, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes auxquels je souhaite ici rendre hommage et exprimer ma profonde gratitude.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance et remercier très chaleureusement mes chers professeurs et encadrants, Professeur Mostafa ELLOUALI ; mon Directeur de thèse à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, Docteur El Mostafa MLJI ; mon Encadrant à l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca et Professeur Hassan LATRACHE ; mon co-directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et accueilli dans leurs laboratoires au sein des équipes enthousiastes et passionnées. Un grand Merci pour votre encadrement consciencieux, disponibilité, conseils pertinents et recommandations avisés. Merci de m'avoir permis d'évoluer dans cet environnement scientifique.

J'adresse également mes sincères gratitude et remerciements à Professeur Hafida ZAHIR, pour son humanité et encouragements, pour toutes les discussions, le soutien et les précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Grâce à vous, j'ai pu réaliser mes travaux de doctorat dans d'excellentes conditions.

Je tiens à présenter tous mes remerciements et ma sincère gratitude aux Professeurs Saad IBNSOUDA KORAICHI et Fatima HAMADI pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche. Je remercie également chaleureusement mes chers Professeurs, Sophie JARRAUD, Soumya ELABED et Jamaa BENGOURAM pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail en acceptant d'être des rapporteurs et honoré ma soutenance de thèse par leur présence.

Pour les expériences de Microscopie à Force Atomique (AFM), j'adresse tous mes remerciements les plus sincères à Professeur Mustapha MABROUKI, pour m'avoir donné l'accès à son laboratoire pour la réalisation des analyses par la Microscopie à Force Atomique. Merci pour ces longues heures passées devant l'AFM, pour toutes les discussions et les interprétations des résultats, votre enthousiasme et collaboration.

Pour les expériences moléculaires, j'ai pu compter sur l'excellente expertise du Centre National de Référence des légionelles (CNRL), à Lyon en France. Je profite l'occasion pour remercier sincèrement

Madame Sophie JARRAUD, pour avoir accepté ma demande de stage et me donner l'accès à son laboratoire pour faire une description des caractéristiques moléculaires des bactéries. Mes remerciements aussi s'adressent à Docteur Christophe GINEVRA, Ingénieur bio-informatique, pour l'analyse et l'interprétation des résultats de l'électrophorèse sur gel en champ pulsé et de séquençage total du génome. Un Grand Merci à Noemie, Lucie, Hanane, Isabelle, Marielle, Corinne et Joelle, techniciennes au CNRL pour leur aide technique, grande disponibilité et la bonne humeur.

Mes remerciements les plus sincères et chaleureux à Professeur Abboudihaj BARGUIGUA. Merci pour ta disponibilité, toutes les discussions et partage d'information, pour toutes les réponses et les choses que j'ai appris de vous. Un Merci ne suffit pas pour vous exprimer ma reconnaissance.

Nos profonds remerciements s'adressent également au Centre National de la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) d'avoir financé la réalisation de ce travail dans le cadre des projets prioritaires de recherche PPR2015/16. Je remercie également le CNRST de m'avoir attribué la bourse d'excellence de recherche pendant trois années.

Je remercie également le Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), de m'avoir attribué la Bourse Calmette & Yersin pour la réalisation de mon stage au CNRL à Lyon en France.

J'aimerais aussi profiter de cette occasion pour remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu durant mon stage à l'Institut Pasteur du Maroc, si il est bien quelqu'un que je dois remercier dans cette rubrique c'est « The Chief », Docteur El Mostafa MLIJI, Merci de m'avoir accompagné sur ce chemin, rempli d'embûches, de m'avoir guidé et facilité les tâches et les procédures pour mener à bien mon travail de recherche que ça soit au niveau de l'Institut Pasteur à Casablanca ou bien durant mon stage au CNRL à Lyon en France. Tu m'as appris à me poser les bonnes questions et à y répondre avec le maximum de rigueur. Un grand Merci à Docteur Hayat ENNAJI, Docteur en Microbiologie cosmétique et pharmaceutique, pour ton encouragement et ton soutien.

Un remerciement particulier à mes parents, Sara, Zakaria et Hajar. Que vous trouvez ici ma grande reconnaissance pour votre aide précieuse et les meilleurs moments que vous m'avez fait vivre au quotidien. Je vous souhaite plein de succès dans la vie.

Je tiens à remercier aussi toute l'équipe Bioprocédés et Bio-interfaces, la belle équipe de passionnés... qui d'ailleurs m'ont transmis le virus ! Merci à vous pour votre soutien, encouragement, esprit d'équipe, générosité, vos précieux conseils et votre bonne humeur, Kaoutar, Chorouk, Safae, Hakim, Btissam, Ayoub, Hajar, Soukaina, Rabha, Mourad, Oubaid, Zakaryae et Doha. J'adresse aussi mes profondes amitiés aux doctorants et étudiants que j'ai eu le plaisir de côtoyer à l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca, au laboratoire et ailleurs. Qu'ils trouvent ici la manifestation de ma gratitude.

Mes sincères remerciements à toutes les personnes, ami(e)s, collègues, professeurs, qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de notre travail.

## RESUME

La colonisation de divers réseaux et circuits d'eau par des bactéries pathogènes est reconnue comme source récurrente de problèmes à la fois industriels et sociétaux. Parmi ces pathogènes on trouve *L. pneumophila*, l'agent bactérien responsable de 80% des cas de la légionellose, il colonise non seulement les environnements naturels mais aussi artificiels à savoir les réseaux d'eau chaude sanitaire (REC) et les tours aéroréfrigérantes. Le développement et la survie de cette bactérie dans ces divers environnements sont essentiellement liés à deux facteurs : la présence d'amibes nécessaires à sa multiplication et la formation du biofilm.

Au Maroc, il n'existe actuellement aucune réglementation en matière de surveillance environnementale et de gestion du risque des légionelles. Par conséquent, la majorité des systèmes d'eaux chaudes sanitaires sont exploités sans aucune connaissance du risque de légionelles ni des interventions ciblées de gestion du risque. Au niveau clinique, l'absence de diagnostic clinique explique le manque de données épidémiologiques au niveau du Royaume.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est de déterminer les éléments d'analyse du risque lié à *L. pneumophila* dans les établissements hôteliers au Maroc. Notre étude sur le terrain s'est intéressée à la collecte des informations propres à l'étude par le biais des enquêtes d'investigation et des questionnaires au niveau des hôtels dans les principales villes touristiques du Maroc à savoir Agadir, Dakhla, Fès, Layoune, Marrakech, Ouarzazate, Rabat et Tanger. Ensuite la réalisation des prélèvements d'eaux au sein des sites de prolifération possible des légionelles comme les eaux chaudes sanitaires des chambres, les jacuzzis, les spas, les robinets et les fontaines décorative, etc. Au niveau du laboratoire, notre travail s'est focalisé sur l'analyse des échantillons, l'étude de la prévalence de *L. pneumophila* dans les établissements hôteliers et la détermination des facteurs de risque associés à la contamination des eaux chaudes sanitaires par cette bactérie. Les souches isolées ont fait par la suite, l'objet des études scientifiques relatives à l'identification et la caractérisation physicochimique et moléculaire, ainsi que l'évaluation de leur profil d'antibiorésistance. D'autre part, la capacité d'adhésion et de formation du biofilm sur les matériaux de la plomberie et la réponse des souches isolées au traitement ont été investiguées.

L'étude de la prévalence et les facteurs de risque soupçonnés d'être lié à la présence de *L. pneumophila* dans les réseaux d'eau chaudes sanitaires a révélé la présence de cette bactérie dans 77 échantillons parmi 149 prélevés et analysés, avec un pourcentage de 51,7% positifs. Parmi les 118 établissements visités, 56,8% d'entre eux sont contaminés par *Legionella*. Le sérotype le plus prévalent est *L. pneumophila* sérotype 2-15, isolé dans 70% des échantillons positifs. Toutefois, 84,4% des échantillons positifs comptaient plus de 1000 UFC/L et le nombre le plus élevé est de  $7,5 \times 10^4$  UFC/L. La température de circulation d'eau chaude sanitaire, l'âge de la plomberie et la taille du bâtiment sont

associés au niveau de contamination et la proportion d'échantillons positifs. L'étude de la résistance aux antibiotiques a montré une sensibilité des souches environnementales isolées de *Legionella* aux différents antibiotiques, couramment prescrit pour le traitement de la légionellose. La Rifampicine est l'antibiotique le plus actif contre les souches isolées et aucune résistance n'a été détecté.

Un typage moléculaire a été réalisé pour 20 souches de *L. pneumophila* sg1 par les techniques d'anticorps monoclonaux (Mabs), l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) et le séquençage du génome (NGS). Le typage par les Mabs a montré une prévalence de Mab 3/1 (n=100%), avec 8 "Camperdown", 7 "Oxford" et 7 "OLDA". La PFGE a détecté 3 différents clones répartis dans plusieurs villes du royaume. La NGS a révélé 3 "sequence type" (ST) avec une fréquence élevée de ST1 (13 souches, 65%), suivi par ST560 (4 souches, 20%) et un nouveau ST identifié pour la première fois auquel le Groupe Européen d'Etude sur les Infections à *Legionella* (ESGLI) a attribué le numéro ST2897.

L'étude du pouvoir adhésif et la capacité de formation de biofilm a montré l'adhésion et la formation du biofilm par *L. pneumophila* aux différents matériaux couramment utilisés pour la distribution des eaux chaudes sanitaires au Maroc, y compris l'acier galvanisé, l'acier inoxydable, le chlorure de vinyle (PVC), le polypropylène (PPR) et le polyéthylène réticulé (PEX-c). Les résultats de la caractérisation physicochimique montrent que la surface des matériaux de plomberie testés présente un caractère hydrophobe, avec une hydrophobicité bien marquée pour l'acier galvanisé et le PPR. 13 souches de *L. pneumophila* ont un caractère hydrophile, tandis que 27 souches présentent un caractère hydrophobe. *L. pneumophila* adhère à la majorité des matériaux testés à l'exception du cuivre. L'acier galvanisé est le matériau le plus colonisé par *L. pneumophila*. L'adhésion de cette bactérie aux matériaux de la plomberie est gouvernée par la rugosité de la surface des matériaux et le caractère donneur/accepteur d'électrons de la surface bactérienne et du substrat. La capacité de formation du biofilm est bien exprimée à 37°C, moyenne à 45°C et faible à 20°C. Le séro groupe 2-15 présente une capacité de formation du biofilm élevée par rapport à *L. pneumophila* sg1. Une fois formés, les biofilms sont difficiles à éradiquer malgré des cycles de traitement. L'étude de l'effet du chlore a montré que les bactéries à l'état planctonique sont capables de résister aux concentrations du chlore résiduel recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (0,2–0,5%). La résistance du biofilm à l'hyperchloration à des concentrations allant jusqu'à 200mg/L est encore plus élevée et démontre que la réglementation en vigueur (50mg/L) n'est pas appropriée pour éliminer cette bactérie des systèmes d'eau. L'utilisation de l'eau de mer contenant le chlorure de sodium (NaCl), comme une approche proposée alternative saine et moins coûteuse pour éliminer *Legionella* notamment pour les hôtels des villes côtières, a révélé que cette bactérie que ça soit à l'état libre ou en biofilms est capable de survie et a continué sa croissance après traitement à des concentrations en NaCl dépassant celles contenues dans l'eau de mer. Ce qui prouve la résistance offerte par la formation du biofilm contre les fortes concentrations en chlore ou en NaCl.

**Mots clés :** *Legionella*, REC, hôtels, adhésion, biofilms, antibiotiques, Mabs, PFGE, NGS.

## ABSTRACT

The colonization of networks and water systems by bacteria is a major concern for both water providers and consumers alike. Among these pathogenic bacteria we found *L. pneumophila*, a Gram-negative waterborne pathogen responsible for the majority of legionellosis cases, is ubiquitous in natural and artificial environments like hot water networks (HWN) and cooling towers. The development and survival of *Legionella* in these environments are essentially related to two factors: the presence of amoeba necessary for its multiplication and the biofilm formation.

In Morocco, there is currently no regulation for environmental *Legionella* monitoring and risk management and no clinical diagnostic for Legionnaire's Disease (LD) patient. Therefore, the majority of the hot water systems are operated without any awareness of *Legionella* risk or targeted risk management interventions. In this context, the purpose of this study was to determine the risk analysis elements related to *Legionella pneumophila* in Moroccan hotels in the main touristic cities including Agadir, Dakhla, Fez, Layoune, Marrakech, Ouarzazate, Rabat et Tanger.

Our field study consists of water sampling and an on-site sanitary investigation including the visual inspection of the boiler rooms, water plumbing network and hygiene conditions. A detailed questionnaire survey was developed and has been completed by the 118 hotels. At the laboratory, our work was focused on samples analysis, prevalence of *L. pneumophila* in hotels and the determination of the risk factors associated with the contamination. The isolated strains were subsequently the subject of scientific studies: Identification, physicochemical and molecular characterization, antibiotic resistance. Moreover, adhesion and biofilm formation tests on plumbing materials.

The prevalence of *Legionella* in hot water systems of residential facilities in Morocco was performed during the period from January 2015 to April 2018. A total of 149 water samples from 118 different water supply systems were analyzed. Possible risk factors were prospectively recorded and data was analyzed in connection with building and plumbing systems characteristics. Out of the 149 samples, 77 (51.7%) were positive for *L. pneumophila*. Serological typing of 77 *L. pneumophila* isolates revealed that 54 are *L. pneumophila* serogroup 2-15 and 23 are *L. pneumophila* serogroup 1. The most prevalent strains were *L. pneumophila* sg2-15, isolated from 70% of the positive samples. 56.8% of all buildings were colonized by *L. pneumophila*. Counts were over 1000 CFU/L in 49%. Contamination was strongly correlated with temperature in the circulation, the age of the premise plumbing and the size of the building.

Susceptibility level of environmental *L. pneumophila* isolates to preferred and recommended therapeutic agents to treat *Legionella* disease was described. All *Legionella* strains were inhibited by low concentrations of macrolides and fluoroquinolones. Rifampicin was the most effective antibiotic against all *Legionella* isolates. None of the *Legionella* strains isolated showed resistance to the tested drugs.

A total of 20 *L. pneumophila* serogroup 1 were typed by Monoclonal Antibody (MAb) subgrouping, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Next-Generation Sequencing (NGS). MAb typing results showed a prevalence of MAb 3/1 with 8 Camperdown, 7 Oxford et 7 OLDA. PFGE analysis detected 5 different genomic clones. NGS analysis revealed 3 different sequence types (ST). ST1 was the most frequently isolated, followed with ST560 and one ST identified for the first time, which the European Study Groupe of *Legionella* Infection (ESGLI) gives number ST2897. This study describes the first Moroccan *L. pneumophila* sg1 strains database, providing molecular epidemiology data useful for future epidemiological investigations, especially of travel associated Legionnaires' diseases cases. The study of adhesion and biofilms formation by *Legionella pneumophila* showed a great capacity to adhere and form biofilm on plumbing materials commonly used in water distribution in morocco. The experimental results confirm the effect of roughness, temperature and physicochemical proprieties of both bacterial surfaces and plumbing materials. Galvanized steel surfaces supported higher numbers of bacterial cells than that the stainless steel and plastic materials at 37 than 20 and 45 °C. Non-viable counts could be obtained from the copper surfaces. *L. pneumophila* sg215 strains presented a higher ability to biofilm formation than *L. pneumophila* sg1. As established, biofilms are difficult to eradicate despite the inclusion of chlorine in potable supplies and frequent chlorination cycles, the bacterium is a recalcitrant human pathogen. *Legionella pneumophila* in the planktonic phase are able to persist in water chlorinated at up to 0.5 mg/L, the maximum permissible under world health organization (WHO) guidelines. Resistance among sessile communities is higher still, and demonstrates that the current regulations are not appropriate for removing the bacterium potable water systems. The use of sea water (NaCl) as an alternative approach to disinfect the water systems of hotels revealed that *L. pneumophila* biofilms were able to survive this treatment and continue to grow. This data provides an insight into the resistance afforded to *L. pneumophila* against high levels of chlorine and NaCl by the formation of biofilms

**Keywords:** *Legionella*, HWN, hotels, adhesion, biofilms, antibiotics, Mabs, PFGE, NGS.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACES</b>	Acide N-(2-acétamido) -2-aminoéthanesulfonique
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFLP</b>	Amplified fragment-length polymorphism
<b>AFM</b>	Atomic Force Microscopie
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>AZI</b>	Azithromycine
<b>BCYE</b>	Buffered Charcoal Yeast Extract
<b>BYE</b>	Broth yeast extract
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CEF</b>	Céfotaxime
<b>CIP</b>	Ciprofloxacine
<b>CLA</b>	Clarithromycine
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CNRL</b>	Centre National de référence des Légionelles
<b>CNRST</b>	Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique
<b>COA</b>	Le carbone organique assimilable
<b>CSHPE</b>	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
<b>DELM</b>	Direction de L'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies
<b>DEX</b>	Dextran
<b>DGS</b>	Direction générale de la santé
<b>DOX</b>	Doxycycline
<b>ECDC</b>	Centre européen de prévention et de contrôle des maladies
<b>ELDSnet</b>	European Legionnaires Disease Surveillance Network
<b>ERY</b>	Erythromycine
<b>ESCMID</b>	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
<b>ESGLI</b>	European Study Group for Legionella Infections
<b>EWGLI</b>	European working Group for Legionella Infections
<b>FISH</b>	Fluorescence In Situ Hybridization
<b>GEM</b>	Gemifloxacin
<b>GVPC</b>	Glycine, Vancomycine, Polymyxine B, Cycloheximide
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique
<b>HWN</b>	Hot Water Networks
<b>HWST</b>	Hot Water System tanks
<b>INH</b>	Institut National d'Hygiène
<b>InVS</b>	Institut de veille sanitaire
<b><i>L. pneumophila</i></b>	<i>Legionella pneumophila</i>



<b>LD</b>	Legionnaires' disease
<b>LEV</b>	Lévofoxacine
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>Mabs</b>	Anticorps Monoclonaux
<b>MATH</b>	Adhésion microbienne aux hydrocarbures
<b>MATS</b>	Adhésion microbienne aux solvants
<b>MDO</b>	Maladie à déclaration obligatoire
<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>Mip</b>	Macrophage infectivity potentiator
<b>MOMP</b>	Major Outer Membran Protein
<b>MOX</b>	Moxifloxacin
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>NGS</b>	New Generation sequencing
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la santé
<b>OTM</b>	Observateur du Tourisme au Maroc
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PCRq</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PEX-c</b>	Polyéthylène réticulé
<b>PFGE</b>	Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>PPR</b>	Polypropylène
<b>PVC</b>	Chlorure de vinyle
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>REC</b>	Réseau d'eau chaude
<b>RECS</b>	Réseau d'eau chaude sanitaire
<b>RIF</b>	Rifampicine
<b>RIIP</b>	Réseau International des Instituts Pasteur
<b>SBT</b>	Sequence-based Typing
<b>ST</b>	Sequence type
<b>TAR</b>	Tours aérorefrigérantes
<b>TELI</b>	Télithromycine
<b>TIG</b>	Tigécycline
<b>UFC</b>	Unité Formant colonies
<b>VBNC</b>	Viable But Not Cultivable
<b>WGS</b>	Whole Generation sequencing
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>XPS</b>	Spectrophotométrie aux rayons X

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> <i>L. pneumophila</i> , microscopie électronique à transmission recolorisée, d'après Fraser (2005).	8
<b>Figure 2.</b> Infection d' <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (B, D, F) et le macrophage U937 (A, C, E) par <i>L. pneumophila</i> (Bitar et al., 2004).	12
<b>Figure 3.</b> Cycle de vie de <i>L. pneumophila</i> dans les protozoaires (Franco et al., 2009).	13
<b>Figure 4.</b> Cellule de <i>Hartmanella vermiformis</i> infectée par <i>L. pneumophila</i> , 12 h après infection (grossissement $\times 3400$ ) (Kwaik et al., 1998).	14
<b>Figure 5.</b> Représentation schématique des cycles de croissance intra- et extracellulaire de <i>L. pneumophila</i> . D'après (Faulkner and Garduño, 2002; Kahn et al., 2002; Garduno et al., 2002; Dietrich et al., 2001).	15
<b>Figure 6.</b> Cycle cellulaire de <i>L. pneumophila</i> dans les amibes et les macrophages humains (Fields et al., 2002b).	16
<b>Figure 7.</b> Développement et relargage de <i>Legionella</i> spp. dans un réseau d'eau potable (Lau and Ashbolt, 2009).	18
<b>Figure 8.</b> Modèle conceptuel pour l'exposition à <i>Legionella</i> par inhalation d'aérosols de douche contenant des légionelles dérivés de la plomberie in situ des bâtiments (Schoen and Ashbolt, 2011).	20
<b>Figure 9.</b> Schéma simplifié de l'appareil pulmonaire et des bronchioles (Thomas, 2004).	21
<b>Figure 10.</b> Evolution du nombre de cas et du taux d'incidence de la légionellose en France et en Bretagne, 2006-2015 (InVS, 2016).	25
<b>Figure 11.</b> Augmentation des cas de légionellose de 286% pour 100 000 habitants durant la période 2000-2014 aux États-Unis (CDC, 2016).	25
<b>Figure 12.</b> Schéma d'interprétation du sous-groupage des <i>L. pneumophila</i> sg1 utilisant le panel d'anticorps monoclonaux de Dresden plus l'anticorps monoclonal 3 de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Helbig et al., 2002).	33
<b>Figure 13.</b> Etapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien (Tremblay et al., 2014).	43
<b>Figure 14.</b> Adhésion initiale des bactéries: système d'interaction entre surface inerte et la bactérie (Bos et al., 1999).	46
<b>Figure 15.</b> Carte des principales villes touristiques sujet de l'enquête (Points en rouge)	52
<b>Figure 16.</b> Résumé illustrant les différentes étapes à suivre pour la recherche et le dénombrement de <i>L. pneumophila</i> .	55
<b>Figure 17.</b> Les différentes étapes de la confirmation présomptive du genre <i>Legionella</i> .	56
<b>Figure 18.</b> Identification des sérogroupes de <i>L. pneumophila</i> par la méthode d'agglutination.	56
<b>Figure 19.</b> Aspect de <i>L. pneumophila</i> sous la loupe binoculaire.	59
<b>Figure 20.</b> Résultat du test d'identification des sérogroupes de <i>L. pneumophila</i> par la méthode d'agglutination.	59
<b>Figure 21.</b> Relation entre le niveau de contamination moyen par <i>Legionella</i> (UFC/ L) (ligne bleue) et nombre d'échantillons prélevés (ligne Verte) à différentes températures de l'eau.	61
<b>Figure 22.</b> Lame 18 puits de la souche à étudier.	74
<b>Figure 23 :</b> Préparation des plugs et du gel de migration.	75
<b>Figure 24 :</b> Schéma général de la technique New Generation Sequencing (Besser et al., 2018).	76

<b>Figure 25 :</b> Résultat positif d'anticorps monoclonaux par la technique d'immunofluorescence.....	77
<b>Figure 26 :</b> Dendrogramme de l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) analyse des clusters de 20 souches de <i>L. pneumophila</i> sg1. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths N.V.). .....	78
<b>Figure 27.</b> Angle de contact comme balance de force. Les énergies apolaires sont indiquées par des flèches pleines horizontales et verticales ; les énergies polaires (Acide-base de Lewis) sont désignées par des flèches à tirets horizontales et verticales.....	84
<b>Figure 28.</b> Appareil d'angle de contact.....	85
<b>Figure 29.</b> Mesure de la topographie de surface des matériaux de la plomberie par la Microscopie à Force Atomique .....	87
<b>Figure 30.</b> Les images tridimensionnelles du verre (a) et des matériaux de plomberie réalisés par la Microscopie à Force Atomique y compris l'acier inoxydable (b), l'acier galvanisé (c), le PVC (d), le PPR (e), le PEX-c (f) et le cuivre (g).....	89
<b>Figure 31.</b> Pourcentage d'adhésion théorique des 40 souches de <i>L. pneumophila</i> aux différents matériaux de la plomberie.....	90
<b>Figure 32.</b> Schéma du test d'adhésion.....	95
<b>Figure 33.</b> Adhésion de <i>L. pneumophila</i> sg1 et sg2-15 aux différents matériaux.....	96
<b>Figure 34.</b> Corrélation entre l'adhésion de <i>L. pneumophila</i> et la rugosité de surface (a), l'hydrophobicité (b), le caractère donneur d'électron(c) et le caractère d'accepteur d'électron(d).....	97
<b>Figure 35.</b> Croissance de biofilm de <i>L. pneumophila</i> sg1 (colonne à gauche) et sg2-15 (colonne à droite) sur l'acier galvanisé (A), l'acier inoxydable (B), PVC (C), PPR (D) et PEX-c (E).....	103
<b>Figure 36.</b> Images tridimensionnelles (topographie de surface) par la microscopie à force atomique avant et après la formation de biofilm par <i>L. pneumophila</i> sg1 et sg2-15.....	105
<b>Figure 37.</b> Corrélation entre le nombre de cellules formant le biofilm à 37 °C et la rugosité de surface. ....	107
<b>Figure 38.</b> Survie de la souche <i>L. pneumophila</i> sg 2-15 dans l'eau du robinet stérile (A) et le milieu BYE (B) en présence et en absence du chlore à différentes concentrations.....	112
<b>Figure 39.</b> Survie de la souche <i>L. pneumophila</i> sg 1 dans l'eau du robinet stérile (A) et le milieu BYE (B) en présence et en absence du chlore à différentes concentrations.....	113
<b>Figure 40.</b> Effet du chlore sur le biofilm de <i>L. pneumophila</i> sg1 formé sur l'acier galvanisé (A&B) et le PVC (C&D) après traitement le 18 <sup>ème</sup> (A&C) et le 30 <sup>ème</sup> jour (B&D). ....	114
<b>Figure 41.</b> Effet du chlore sur le biofilm de <i>L. pneumophila</i> sg2-15 formé sur l'acier galvanisé (A&B) et le PVC (C&D) après traitement le 18 <sup>ème</sup> (A&C) et le 30 <sup>ème</sup> jour (B&D).....	115
<b>Figure 42.</b> La survie de <i>L. pneumophila</i> sg1 dans l'eau de robinet stérile en présence et en absence de chlorure de sodium à différentes concentrations à 20°C (A) et à 37°C (B).....	120
<b>Figure 43.</b> La survie de <i>L. pneumophila</i> sg2-15 dans l'eau de robinet stérile en présence et en absence de chlorure de sodium à différentes concentrations à 20°C (A) et à 37°C (B). ....	120
<b>Figure 44.</b> Effet de chlorure de sodium sur la croissance du biofilm de <i>L. pneumophila</i> après traitement de 6 heures le 6 <sup>ème</sup> et 15 <sup>ème</sup> jour.....	122

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.</b> Comparaison des méthodes de culture et de PCRq (d'après le rapport de l'ANSES 2011, méthodes de détection et de dénombrement de <i>Legionella</i> dans l'eau) .....	32
<b>Tableau II.</b> Définition du niveau de contamination par <i>Legionella</i> dans l'eau potable .....	57
<b>Tableau III.</b> L'effet des facteurs environnementaux sur la colonisation par <i>L. pneumophila</i> dans les systèmes d'eaux chaudes étudiés.....	58
<b>Tableau IV.</b> Prévalence et niveau de contamination par <i>L. pneumophila</i> des échantillons analysés..	60
<b>Tableau V.</b> Prévalence et niveau de contamination par <i>Legionella pneumophila</i> des systèmes d'eau chaudes des hôtels étudiés (n = 118). La gravité de la colonisation est caractérisée par le nombre maximal détecté dans le bâtiment. ....	60
<b>Tableau VI.</b> Les valeurs cumulatives des CMI relatives à la sensibilité des soixante souches aux antibiotiques testés .....	68
<b>Tableau VII.</b> Les valeurs de CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> des douze antibiotiques testés contre les soixante souches .....	69
<b>Tableau VIII :</b> Répartition des profils SBT des 20 <i>L. pneumophila</i> sg1. ....	79
<b>Tableau IX.</b> Composantes Van der Waals, accepteur d'électrons et donneur d'électrons de l'énergie libre des trois liquides utilisés dans la méthode des angles de contacts.....	85
<b>Tableau X.</b> Angle de contact par rapport aux différents solvants, énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{\text{wi}}$ ) et le caractère donneur/accepteur d'électron des matériaux : .....	88
<b>Tableau XI.</b> Les valeurs de l'angles de contact avec l'écart-type ( $^{\circ}$ ), les valeurs d'énergie de surface avec l'écart type ( $\text{mJ m}^{-2}$ ) des cellules bactériennes.....	95
<b>Tableau XII.</b> La distribution statistique de la hauteur de surface des biofilms .....	104

## TABLE DES MATIERES

<b>DEDICACES .....</b>	<b>I</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>II</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJECTIF DU TRAVAIL.....</b>	<b>4</b>
<b>PLAN DE TRAVAIL .....</b>	<b>5</b>
<b>PARTIE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>6</b>
<b>Chapitre I. <i>Legionella</i> et Légionellose : Mise au point sur les connaissances .....</b>	<b>7</b>
I.1. Présentation de la bactérie.....	7
I.1.1. Historique.....	7
I.1.2. Taxonomie et classification.....	7
I.1.3. Morphologie de la bactérie .....	8
I.1.4. Caractères biologiques et culturels .....	9
I.2. Ecologie de la bactérie .....	10
I.2.1. Environnements naturels.....	10
I.2.2. Environnements anthropiques.....	10
I.2.3. Cycle de réplication et interaction avec les amibes.....	12
I.3. Association aux biofilms.....	16
I.4. Epidémiologie .....	19
I.4.1. Mode de transmission .....	19
I.4.2. Pathologie.....	20
I.4.3. Les facteurs de risque.....	23
I.4.4. Surveillance épidémiologique .....	23
I.5. Virulence chez <i>Legionella</i> .....	27
I.5.1. Facteurs de virulence et structures de la surface bactérienne.....	27
I.5.2. Les systèmes de sécrétion .....	28

I.5.3. Autres facteurs de virulence.....	29
<b>Chapitre II. Méthodes de détection et de caractérisation moléculaire et physicochimique de <i>Legionella</i> .....</b>	<b>30</b>
I. Méthodes classiques de culture.....	30
II. Méthodes de biologie moléculaire.....	30
III. Méthodes de typage moléculaire.....	33
IV. Méthodes de caractérisation physico-chimique de surface .....	35
<b>Chapitre III. <i>Legionella</i> dans les réseaux d'eaux chaudes.....</b>	<b>37</b>
I. Introduction.....	37
II. Paramètres associés à la croissance .....	37
II.1. La température .....	37
II.2. Le régime hydrodynamique .....	38
II.3. La nature des matériaux .....	38
II.4. La qualité physico-chimique de l'eau .....	39
III. Le traitement anti- <i>Legionella</i> .....	40
<b>Chapitre IV. Adhésion bactérienne et formation de biofilm .....</b>	<b>41</b>
I. Introduction.....	41
II. Mécanismes d'adhésion et de développement bactérien .....	43
II.1. Etape d'adhésion.....	43
II.1.1. Mise en place du film conditionnant.....	44
II.1.2. Transfert des bactéries vers le support.....	44
II.1.3. Adhésion réversible (adhésion non spécifique) .....	45
II.1.4. Adhésion irréversible (adhésion spécifique).....	47
II.2. Prolifération et architecture du biofilm.....	47
II.2.1. Croissance et maturation du biofilm.....	47
II.2.2. Dispersion du biofilm .....	48
<b>PARTIE II. TRAVAIL EXPERIMENTAL.....</b>	<b>49</b>
<b>Chapitre I : Enquête épidémiologique nationale et détermination de la prévalence de <i>L. pneumophila</i> dans les établissements hôteliers du Maroc .....</b>	<b>50</b>
I. Introduction.....	50
II. Matériel et méthodes.....	51
III. Résultats .....	57
IV. Discussion .....	61
V. Conclusion.....	64
<b>Chapitre II. Susceptibilité des souches de <i>Legionella</i> spp. aux antibiotiques .....</b>	<b>66</b>

I. Introduction.....	66
II. Matériel et méthodes.....	66
III. Résultats .....	67
VI. Discussion .....	70
V. Conclusion.....	72
<b>Chapitre III. Caractérisation moléculaire des souches de <i>L. pneumophila</i>.....</b>	<b>73</b>
I. Introduction.....	73
II. Matériel et méthodes.....	73
III. Résultats .....	77
IV. Discussion .....	80
V. Conclusion.....	82
<b>Chapitre IV. Caractérisation physicochimique de la surface bactérienne et de substrat.....</b>	<b>83</b>
I. Introduction.....	83
II. Matériel et méthodes.....	83
III. Résultats .....	87
IV. Discussion .....	90
<b>Chapitre V. Adhésion de <i>L. pneumophila</i> au verre et aux matériaux de la plomberie .....</b>	<b>93</b>
I. Introduction.....	93
II. Matériel et méthodes.....	94
III. Résultats .....	95
IV. Discussion .....	97
V. Conclusion.....	99
<b>Chapitre VI. Formation de biofilm par <i>L. pneumophila</i> sur les matériaux de la plomberie .....</b>	<b>100</b>
I. Introduction.....	100
II. Matériel et méthodes.....	100
III. Résultats .....	101
IV. Discussion .....	106
V. Conclusion.....	108
<b>Chapitre VII. Effet du chlore sur la survie de <i>Legionella pneumophila</i> à l'état planctonique et en biofilm.....</b>	<b>110</b>
I. Introduction.....	110
II. Matériel et méthodes.....	111
III. Résultats .....	112
IV. Discussion .....	115
V. Conclusion.....	117

<b>Chapitre VIII. Effet de la salinité sur la survie de <i>L. pneumophila</i> à l'état planctonique et en biofilm.....</b>	<b>118</b>
I. Introduction.....	118
II. Matériel et méthodes.....	118
III. Résultats .....	119
IV. Discussion .....	122
V. Conclusion.....	124
<b>CONCLUSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>125</b>
<b>REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>128</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>150</b>



## INTRODUCTION GENERALE

La colonisation de divers réseaux et circuits d'eau par des bactéries est reconnue comme source récurrente de problèmes à la fois industriels et sociétaux. Cette biomasse fixée sur les parois des réseaux et insérée dans une matrice de polymères organiques, appelée biofilm, peut induire, d'une part la dégradation et la corrosion des matériaux colonisés avec relargage potentiel de substances affectant la qualité de l'eau. D'autre part, il peut causer des problèmes de contamination microbienne des eaux transportées et même des infections humaines. Parmi les bactéries à risque les plus représentatives dans ces environnements, on peut citer : *Legionella spp*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori* et *Mycobacterium spp*.

*Legionella* colonise les environnements naturels et artificiels telles que les réseaux d'eaux chaudes sanitaires (RECS) et les tours aéroréfrigérantes (TAR). Elle est, en effet, responsable de deux types d'infection respiratoire, l'une bénigne et pseudo-grippale, appelée Fièvre de Pontiac et l'autre aigüe dite maladie des légionnaires, mortelle dans 10 % des cas, transmissible exclusivement par inhalation d'aérosols générés par des systèmes d'eau, tels que les systèmes d'eaux chaudes sanitaires, les tours de refroidissement, les douches, les spas et les robinets (Craun et al., 2010; Mondino et al., 2019). Bien que l'on ne pense pas que la transmission interhumaine se produise, un cas a été rapporté, ce qui suggère que cette forme de transmission peut exister, mais elle est rare (Correia et al., 2016). *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) est l'espèce la plus impliquée dans la maladie des légionnaires et responsable de 91,5% des infections humaines, en particulier le sérotype 1 qui est l'agent le plus pathogène, provoquant la majorité des maladies des légionnaires (84,2%) (Guyard and Low, 2011; Alexandropoulou et al., 2015). En 2014, 4 486 cas ont été signalés par les autorités sanitaires américaines (Kruse et al., 2016) et en 2015, un total de 6 986 cas de légionellose a été déclaré en Europe (Beauté, 2017). En Chine, en Europe, en Australie et aux États-Unis d'Amérique, on détecte environ 10-15 cas par million d'habitants par an (Qin et al., 2019; Mondino et al., 2019; Cassell et al., 2019). Dans de nombreux pays, le nombre total de cas est probablement plus élevé que ne le suggèrent les données de notification dues à l'absence de diagnostic et de surveillance (Phin et al., 2014).

L'Organisation Mondiale de la Santé affirme que l'incidence de la légionellose varie largement en fonction du niveau de surveillance et de notification (Bartram, 2007; Phin et al., 2014). Comme de nombreux pays ne disposent pas de moyens adaptés pour diagnostiquer l'infection ou n'ont pas de systèmes de surveillance suffisants, la véritable fréquence est inconnue.

Dans divers pays d'Europe comme la France, la maladie des légionnaires est soumise à déclaration obligatoire (MDO) depuis 1987 (Campese et al., 2015) et plusieurs textes réglementaires à savoir des arrêtés et des circulaires s'appliquant à la gestion du risque des Légionelles dans les établissements

recevant du public (ERP), dont font partie les établissements de tourisme, notamment, l'Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

Le Maroc reste l'un des pays dépourvus de données épidémiologiques sur la légionellose et la maladie passe confondue avec les autres pneumopathies les plus connues, ce qui fait que la situation de la maladie est encore méconnue et la prévalence de *L. pneumophila* est sous-évaluée par le fait que ni la législation ni la communication sur le risque *Legionella* n'ont été appuyées (Bulletin INH, 2017). Bien que la légionellose ne soit pas incluse dans la liste des maladies à déclaration obligatoire, le Maroc fait partie du réseau des pays partenaires de l'Union Européenne pour le contrôle et la prévention des maladies transmissibles depuis 2016, le correspondant de ce réseau au Maroc est les représentants de l'Institut National d'Hygiène (INH) et de la Direction de L'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies (DELM), pour le contrôle de la maladie des légionnaires (Bulletin INH, 2017). Ce programme, coordonné par le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies (ECDC), permet de prévenir des cas, d'empêcher l'apparition de clusters ou d'épidémies de légionellose liés aux voyages via un rapportage standardisé, entre les pays européens, des légionelloses acquises lors d'un voyage (Beauté, 2017; ECDC, 2018).

Actuellement, il n'existe aucune réglementation en matière de surveillance environnementale et de gestion du risque des légionelles au Maroc. Par conséquent, la majorité des systèmes d'eaux chaudes sanitaires des établissements recevant du public sont exploités sans aucune connaissance du risque de légionelles ni d'interventions ciblées de gestion du risque. Toutefois, les principes de la loi sur l'eau restent quand même très utiles (Loi N° 36-15). Au niveau clinique, l'absence de diagnostic clinique explique le manque de données épidémiologiques au niveau du Royaume (Bulletin INH, 2017). Par ailleurs, la stratégie sanitaire au Maroc est en attente de l'instauration d'un plan d'action qui encadre les dangers liés aux légionelles et inscrit la légionellose comme une maladie à déclaration obligatoire.

La problématique de la légionellose ne concerne pas seulement les professions médicales, mais aussi le secteur touristique sachant qu'environ 10 millions de touristes visitent le Maroc chaque année (OTM, 2017). En vertu du nombre de touristes, à la fois important et en augmentation continue, le Maroc doit leur assurer un séjour sécurisé sur le plan sanitaire, et cerner toutes les défaillances qui pourraient nuire à l'option de « Tourisme Durable » et cela par l'instauration d'une réglementation qui impose aux établissements recevant du public, possédant des points d'usage à risque (douches, bains à remous, douchettes cuisine, ...), de mettre en œuvre une surveillance de leurs installations collectives de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

Dans ce contexte, nous menons un travail qui s'intéresse à la détermination d'éléments d'analyse de risque relatif à *L. pneumophila* dans les établissements hôteliers marocains. Ce travail scientifique, entre dans le cadre d'un projet de recherche financé par le Centre National pour la Recherche Scientifique et

Techniques (CNRST) et porté par un consortium qui regroupe le Laboratoire de la Microbiologie des Eaux et Hygiène de l'Environnement de l'Institut Pasteur du Maroc et d'autres partenaires dont figure le Laboratoire de Bioprocédés et Bio-interfaces de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal. A cet effet, une cartographie d'étude a été consentie entre le ministère du tourisme marocain et l'Institut Pasteur du Maroc, c'est ainsi que les structures ciblées par cette étude sont des établissements hôteliers dans les principales villes touristiques du Maroc à savoir Agadir, Casablanca, Dakhla, Fès, Layoune, Marrakech, Ouarzazate, Rabat et Tanger.

Par ailleurs, la maîtrise et la connaissance approfondie des différents mécanismes impliqués dans la contamination, la colonisation et la persistance de *Legionella* dans les systèmes d'eaux chaudes sanitaires, ainsi que la détermination des caractéristiques moléculaires et le profil d'antibiorésistance des souches circulant au Maroc, sont donc un objectif prioritaire qui pourrait apporter des réponses importantes aux différentes questions relatives à la gestion du risque de *Legionella*, dans les établissements hôteliers, et limiter les infections par la légionellose.

Ce manuscrit est composé de deux parties, la première s'intéresse à la synthèse bibliographique, dans laquelle seront abordés l'ensemble des aspects relatifs à l'écologie, à l'épidémiologie et à la virulence de la bactérie, ainsi que l'état des lieux au Maroc. La deuxième partie, quant à elle, sera consacré au volet expérimental et à la présentation de notre travail de recherche et des résultats obtenus.

## OBJECTIF DU TRAVAIL

Pour rassembler le maximum de données scientifiques qui pourraient servir à la gestion du risque de *Legionella* spp., notre travail a fixé comme objectifs :

- Rassembler et collecter l'ensemble des informations et des données relatives à la situation de la présence de *Legionella* au Maroc et les installations qui auraient pu être à l'origine des infections à travers une Enquête Nationale. Il s'agit d'évaluer la prévalence de *Legionella* dans les systèmes d'eau chaude, des hôtels au Maroc, à travers une campagne des prélèvements et d'échantillonnage et d'étudier les facteurs de risque associés à la contamination, soupçonnés d'être liés à la présence et/ou à la croissance de *Legionella*.
- Faire une description des caractéristiques moléculaires des souches isolées par les techniques de typage moléculaire et étudier leurs profil d'antibiorésistance.
- Déterminer les caractéristiques physicochimiques de surface des souches isolées et des matériaux de la plomberie, couramment utilisés pour la distribution d'eau chaude sanitaire, par la méthode de l'angle de contact, pour une meilleure compréhension des interactions interfaciales entre le pathogène et les matériaux de la plomberie.
- Etudier l'adhésion des souches de *L. pneumophila* sur la surface des matériaux couramment utilisés pour la distribution d'eau chaude sanitaire et observation par la microscopie à force atomique (AFM), pour évaluer le pouvoir contaminant et adhésif bactérien et pouvoir définir les matériaux les plus propices pour la distribution de l'eau.
- Etudier l'effet de la température, du chlore et du chlorure de sodium (NaCl) sur la survie et la formation de biofilms par *L. pneumophila* sur les matériaux de plomberies, et ceci, pour contribuer à l'analyse des risques du phénomène de biocontamination par les légionelles.

## PLAN DE TRAVAIL

Ce travail s'articule en 4 parties :

- 1. Enquête épidémiologique nationale et détermination de la prévalence de *Legionella pneumophila* dans les établissements hôteliers du Maroc :**
  - Etablissement d'une cartographie des sites de prélèvements (Les établissements hôteliers des principales villes touristiques du Maroc).
  - Etablir un questionnaire pour la collecte d'informations liées au risque *Legionella* au sein des établissements hôteliers.
  - Rassembler et collecter le maximum de données sur la situation de la présence de cette bactérie dans les installations à risque, et les facteurs de risque associés à la contamination, soupçonnés d'être liés à la présence et à la croissance de *Legionella*.
  - Inspection visuelle des locaux de production de l'eau chaude, et réalisation des prélèvements au sein des établissements hôteliers, connus par leur activité touristique au Maroc.
  - Recherche et dénombrement des légionelles dans les échantillons d'eau chaude sanitaire prélevés, identification et conservation des isolats.
  - Détermination de la prévalence de *Legionella pneumophila*.
- 2. Caractérisation moléculaire des souches isolées et étude de la résistance aux antibiotiques :**
  - Susceptibilité des souches de *Legionella* spp. aux antibiotiques.
  - Caractérisation moléculaire des isolats par les techniques de typage moléculaire et séquençage du génome.
- 3. Etude de l'adhésion et la formation de biofilm par *Legionella pneumophila* :**
  - Caractérisation physicochimique de surface des isolats et des matériaux de la plomberie, couramment utilisés pour la distribution d'eau chaude sanitaire, par la méthode de l'angle de contact.
  - Etude de l'adhésion des souches de *Legionella pneumophila* à la surface des matériaux de plomberie.
  - Etude de l'effet de la température et des matériaux de la plomberie sur la formation de biofilms par *Legionella pneumophila*.
  - Observation de la topographie de surface du biofilm par la Microscopie à Force Atomique (AFM).
- 4. Etude de l'effet du chlore et du chlorure de sodium (NaCl) sur la survie de *Legionella pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm :**
  - Etude de l'effet du chlore sur la survie de *Legionella pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm.
  - Etude de l'effet de la salinité sur la survie de *Legionella pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm.

---

***PARTIE I :***

***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

---

## Chapitre I. *Legionella* et Légionellose : Mise au point sur les connaissances

### I.1. Présentation de la bactérie

#### I.1.1. Historique

Au cours de la 56<sup>ème</sup> convention de la légion américaine à Philadelphie en 1976, 4400 vétérans résident dans un hôtel et participant à cette convention, 182 d'entre eux ont été atteints d'une pneumonie atypique, provoquant 34 décès (Fraser et al., 1977; McDade et al., 1977). L'enquête a montré que le système de climatisation de l'hôtel dans lequel étaient logés les vétérans était en cause dans la contamination des sujets atteints (Fraser et al., 1977; Kac and Fagon, 2002). L'agent bactérien responsable de cette épidémie, est un bacille Gram négatif fut isolé environ 6 mois plus tard par Joseph McDade et Charles Shepard (CDC : Center for Disease Control and prevention) en infectant des cobayes par voie intra-nasale selon un protocole utilisé pour la recherche de *Rickettsia* (agent responsable du typhus) et de la lèpre (McDade et al., 1977; Brenner et al., 1979). Il a été nommé *Legionella* en référence aux légionnaires victimes de cette épidémie. La maladie a, quant à elle, été appelée « maladie des légionnaires » ou légionellose.

L'infection, qui n'avait causé aucun décès, s'était manifestée par une forte fièvre (d'où le nom de fièvre de Pontiac) accompagnée de myalgies et symptômes neurologiques (Glick et al., 1978). Des analyses rétrospectives effectuées sur des échantillons isolés antérieurement lors d'une épidémie qui s'était déclarée en 1968 à Pontiac (Michigan) ont permis de mettre en évidence des cas de légionellose bien avant 1976, dans les années 1947 à 1959 (McDade et al., 1977).

#### I.1.2. Taxonomie et classification

*Legionella* appartient au phylum *Gammaproteobacteria*. A ce jour, la famille *Legionellaceae* se compose d'un seul genre, *Legionella*. Cette bactérie responsable de la maladie du légionnaire a été caractérisée en 1977 (Brenner et al., 1979). Le genre *Legionella* forme donc un groupe cohérent placer dans l'ordre des *Legionellales* qui est le seul représentant de la sous-division gamma-2 des protéobactéries. Deux autres genres ont été proposés : *Fluoribacter* pour les espèces fluorescentes telles que *L. bozemanii* et *Tatlockia* pour l'espèce *L. micdadei*, mais les études récentes portant sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S ont confirmé que la famille *Legionellaceae* ne comprend qu'un seul phylum (Fields et al., 2002b).

Actuellement, 53 espèces de *Legionella* réparties en 70 sérogroupes ont été décrites (Fields et al., 2002b; Diederer, 2008). Les différents sérogroupes sont définis par les antigènes O des lipopolysaccharides (Ciesielski et al., 1986).

*Legionella pneumophila* est la bactérie la plus importante en pathologie humaine puisqu'elle est la plus fréquemment identifiée lors des épidémies de légionellose (80 à 85 % des cas). Elle comprend entre 15 et 16 différents sérogroupes selon les auteurs parmi lesquels les sérogroupes 1 et 6 qui sont responsables

de deux tiers des infections (Diederer, 2008; Victor et al., 2002). Les espèces autres que *L. pneumophila* ne sont impliquées que dans environ 20% des infections (Benhamou *et al.*, 2005). Les espèces les plus souvent mises en cause sont *L. longbeachae*, *L. micdadei*, *L. dumoffii* (la quatrième ou cinquième espèce engendrant la légionellose) et *L. bozemanii*. Ces bactéries ont été isolées principalement chez des malades immunodéprimés (Ohnishi et al., 2004; Jarraud et al., 1999).

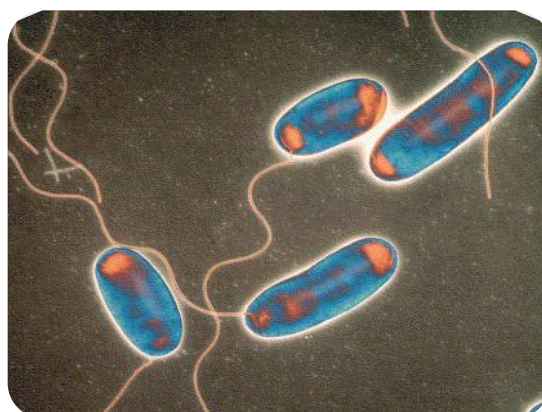
Toutes les espèces de légionnelles isolées de sources cliniques ont également été détectées dans l'environnement à l'exception de *L. hackeliae* et *L. tusconensis* (Edelstein and Cianciotto, 2006).

### I.1.3. Morphologie de la bactérie

Les légionnelles sont des bacilles à gram négatif de taille comprise entre 0,3 et 0,9µm de largeur et entre 2 et 20µm de longueur (Rodgers et al., 1978; Chandler et al., 1979; Winn, 1988). Ces variations de taille sont en partie dues, pour les légionnelles comme pour la plupart des bactéries, à la modification des conditions environnementales. De plus, chez les légionnelles, la taille de la bactérie est significativement réduite, avec des longueurs de moins de 1 µm, après leur passage intra-amibien (Byrne and Swanson, 1998).

Ces bactéries sont aérobies stricts, non capsulées, non sporulées et peuvent présenter en culture des formes allongées parfois filamenteuses (Diederer, 2008) (Figure 1).

Les légionnelles sont mobiles à l'exception de trois espèces (*L. oakridgensis*, *L. londiniensis* et *L. natarum*), elles utilisent un ou plusieurs flagelles polaires ou subpolaires pour assurer une mobilité lente par glissement (Thomason et al., 1979) et sont couvertes par des pili distribués sur toute la surface des bactéries (Rodgers et al., 1978; Rodgers et al., 1980). Ce flagelle peut atteindre 8 µm de long et 14 à 25 µm de diamètre (Winn, 1988; Rodgers et al., 1980).



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



La flagellation des légionelles est en fonction notamment de la température ou du cycle de vie de la bactérie. Le flagelle est attaché à la paroi cellulaire par un corps basal formant un crochet comme c'est le cas pour les autres bactéries gram négatives. La microscopie électronique a également permis de déceler la présence de pili répartis à la surface de la bactérie (Rodgers et al., 1980). Les pili nommés pili de type IV seraient à l'origine du déplacement des légionelles grâce à une extension de ces pili suivie d'un attachement au support et enfin d'une rétraction, permettant ainsi l'avancée de la bactérie par « twitching » (Coil and Anné, 2009). Stewart et al. (2009) observent une autre forme de déplacement par « glissement » qui ne serait due 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.

#### **I.1.4. Caractères biologiques et culturels**

Les légionelles sont des bactéries uréase-négatives, elles n'hydrolysent pas les sucres (ni fermentation ni oxydation) et sont catalases positives (sauf *L. worleiensis*). Ces bactéries possèdent deux catalases (KatA et KatB), hydrolysent l'hippurate et la gélatine (Hebert, 1981). La plupart des espèces produisent une  $\beta$ -lactamase et les réactions d'oxydase sont variables selon les espèces.

Elles sont chimio-organotrophes et utilisent les acides aminés comme source d'énergie et de carbone (Benson and Fields, 1998). Ces bactéries synthétisent plus d'acides gras ramifiés que d'acides gras non ramifiés. 40 à 90% des acides gras sont ramifiés (Lambert and Moss, 1989), ce point est notable, car ces acides gras sont fréquents chez les bactéries à Gram positif et rares ou présents en très faible quantité chez les bactéries à Gram négatif (Garrigues and Veron, 1987).

Les légionelles ont des besoins nutritionnels complexes et particuliers. Elles sont auxotrophes vis-à-vis de certains acides aminés, notamment la L-cystéine et la méthionine (Jernigan et al., 1996). Elles se distinguent des autres bactéries saccharolytiques par leurs exigences en sels de fer lors du primo-isollement sur des milieux solides (Diederer, 2008).

Les réactions aux tests d'oxydase sont variables, par contre les réactions pour la réduction des nitrates, de l'uréase et de l'utilisation des carbohydrates sont négatives (Fields et al., 2002b). La croissance de *L. pneumophila* ne requiert ni glucose ni polysaccharides, les acides aminés étant la principale source de carbone. La cystéine et la méthionine sont nécessaires pour sa croissance, la sérine, la thréonine, l'histidine, la tyrosine et le tryptophane peuvent également constituer des sources d'énergie (Pine et al., 1979).

La culture des bactéries du genre *Legionella* est favorisée en présence de 2,5 % de CO<sub>2</sub> et nécessite la présence de L-cystéine et de fer dans le milieu. La croissance est optimale à un pH très légèrement acide de l'ordre de 6,8-6,9 et, pour la majorité des espèces, à une température de 36 +/- 1 °C pendant 3 à 10 jours.

Les cultures sont généralement réalisées en milieu BYE (Bouillon d'Extrait de Levure) supplémenté en L-cystéine, en tampon ACES (Acide N-(2-acétamido)-2-aminoéthanesulfonique) et en fer, et additionné d'agar et de charbon (milieu BCYE) pour les cultures en milieu solide (Feeley et al., 1979). La source de fer peut varier et provenir de différentes formes du fer : nitrate de fer, sulfate de fer, chlorure de fer, hématine ou hémine, mais les meilleurs résultats sont obtenus avec du pyrophosphate de fer.

Les colonies de *Legionella* après croissance sur milieu gélosé BCYE apparaissent grisâtres, de consistance muqueuse, de taille hétérogène et présentent généralement un aspect en « verre brisé » lorsqu'elles sont observées à la loupe binoculaire.

## **I.2. Ecologie de la bactérie**

*Legionella* est présente dans tous les environnements aquatiques (Steinert et al., 2002), retrouvée aussi bien dans les environnements naturels (lacs, rivières) que dans les environnements artificiels (réseaux d'eau chaude sanitaire, tours aéroréfrigérantes, ...) (Veronesi et al., 2007; Mekhour et al., 2013b; Boer et al., 2002).

### **I.2.1. Environnements naturels**

*Legionella* a été détectée dans de nombreux lacs et rivières lors d'une étude menée dès les années 80 (Fliermans et al., 1981). Elle a également été trouvée dans des biofilms d'eau et des eaux souterraines (Riffard et al., 2001), dans des eaux de pluie de forêts et des eaux de mer côtières (Ortiz-Roque and Hazen, 1987). La bactérie peut survivre dans des environnements marins à condition que la température de l'eau soit faible ( $< 20^{\circ}\text{C}$ ) (Heller et al., 1998). Les océans collectent les eaux provenant des rivières où *Legionella* est présente et la bactérie peut survivre dans ces eaux de baignade durant des périodes prolongées (Palmer et al., 1993). La pluie pourrait également être un facteur de dissémination de ce micro-organisme dans l'environnement. La présence de *Legionella* dans les flaques d'eau sur les routes, surtout en saison chaude pourrait même être un facteur de contact fréquent avec des aérosols contaminés (Sakamoto et al., 2009). De plus, dans certains environnements aquatiques naturels (eaux de sources contaminées par le sol ou le sous-sol et à des températures inférieures à  $20^{\circ}\text{C}$ ), *Legionella* peut être présente à des concentrations trop faibles pour être détectée par les méthodes de culture. De telles eaux peuvent potentiellement importer *Legionella* dans des réservoirs et réseaux où les conditions physiques et chimiques permettent leur développement (WHO, 2011).

### **I.2.2. Environnements anthropiques**

Les légionelles sont présentes dans tous les environnements humides. Elles sont également retrouvées dans des installations générant des aérosols telles que les tours aéroréfrigérantes (TAR), les jacuzzis, les spas, les piscines, les machines à glace, les fontaines décoratives, les installations de production et

de distribution d'eau chaude sanitaire (ballons de stockage, réseaux d'eau, pommeaux de douche, robinets, etc) dans les établissements recevant du public, dont on trouve les hôtels, les hôpitaux, les établissements thermaux, les logements collectifs et les maisons individuelles (Atlas, 1999; Steinert et al., 2002; Barna et al., 2016).

La température des eaux des tours aéroréfrigérantes est probablement un facteur important engendrant une augmentation de la population de *L. pneumophila* (Koide et al., 1993; Wuthrich et al., 2019). L'existence d'autres organismes de la communauté microbienne pourrait aussi être un facteur de la stimulation de la population de *Legionella* (Yamamoto et al., 1992; Buse et al., 2017). Dans une étude en 2009, sur un total de 96 TAR examinées (hôtel, hôpitaux, installations sportives, centres commerciaux), 47 soit 48,9% étaient colonisées par *Legionella* spp (Mouchtouri et al., 2010). Cette étude révèle que le risque sanitaire est accru pour les installations les plus anciennes car la proportion de TAR colonisées par *L. pneumophila* y est plus importante. De façon plus globale ces installations sont considérées par certains comme des « hotspots » pour l'émergence de pathogènes humains (Berk et al., 2006).

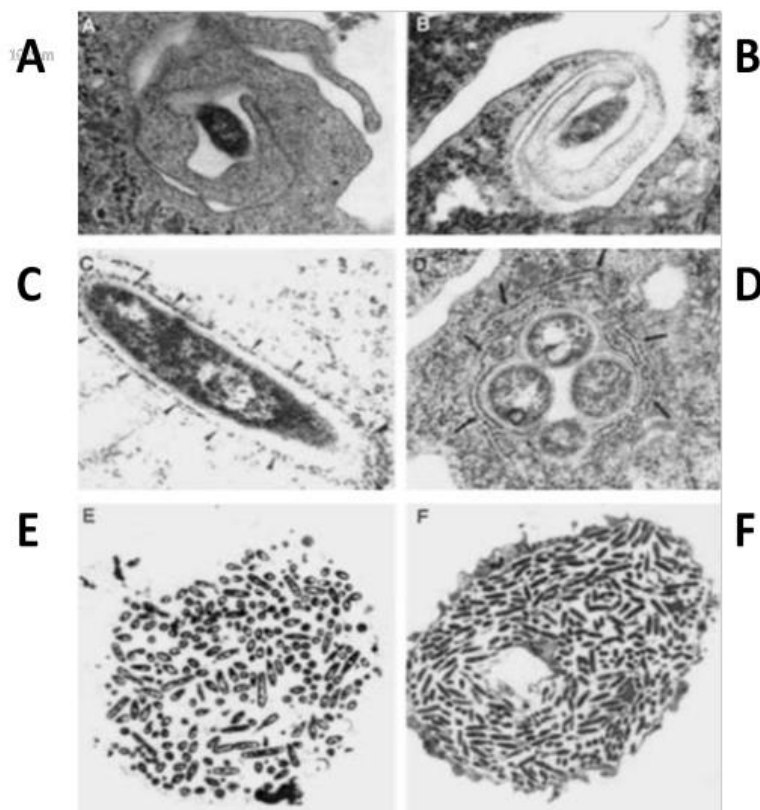
Des études environnementales réalisées essentiellement dans des lieux collectifs ont montré que 37 à 70% des équipements collectifs de distribution d'eau chaude étudiés contenaient des *Legionella*, à une concentration variant de 5 à  $10^6$  UFC/L (CSHPF, 2005). Une étude réalisée par Borella et al. (2004) sur la prévalence des *Legionella* dans les réseaux d'eau des établissements recevant du public a montré que 22,6% des prélèvements d'eau dans ce type de réseaux se sont révélés positifs à *Legionella*, et parmi ces 22,6%, 75,8% correspondaient à *L. pneumophila*, 41,8 % des établissements ont au moins une analyse positive ; pour les établissements de santé, 34,3% des analyses sont positives et 21,8% sont supérieures à  $10^3$  UFC/L ; pour les établissements recevant du public, 26,8% des analyses sont positives et 12,5 % ont des résultats supérieurs à 1000 UFC/L, les concentrations dans ces réseaux peuvent s'avérer élevées puisque certains prélèvements (9,2%) contenaient plus de  $10^4$  UFC/L (Borella et al., 2004). Une autre étude a révélé que les circuits d'eau hospitaliers (hôpitaux, centres de réhabilitation, maisons de retraite) peuvent également être contaminés par *L. pneumophila* où 32% des 625 prélèvements se sont avérés positifs à *Legionella* (Arvand et al., 2011). D'autres études portant sur la détermination de la prévalence de *Legionella* dans les différents systèmes hydriques artificiels à savoir les réseaux d'eau chaude sanitaire et les tours aéroréfrigérantes ont montré des taux de contamination et d'isolement élevés (Erdogan and Arslan, 2015; Khaleedi et al., 2019; Felice et al., 2019; De Giglio et al., 2019)

Au niveau national, une étude réalisée par Tai et al. (2012b) sur la prévalence de *Legionella* dans les réseaux d'eaux chaudes sanitaires des établissements hôteliers (n=22), des établissements de santé (n=5) et des usines (n=12), a montré que sur l'ensemble des échantillons analysés (n=128), les résultats de recherche ont montré la présence de *L. pneumophila* sur 25 échantillons, ce qui représente 19,5 % du nombre total des échantillons analysés.

### I.2.3. Cycle de réplication et interaction avec les amibes

Les amibes sont des protozoaires (eucaryotes unicellulaires) de tailles variantes entre 20  $\mu\text{m}$  et 1 mm de longueur, mais le plus souvent comprise entre 200 et 500  $\mu\text{m}$ . Omniprésents dans les milieux aquatiques, elles se nourrissent principalement de bactéries et microalgues qu'elles phagocytent (Greub and Raoult, 2004). Fields et al. (2002b) ont identifié 14 espèces d'amibes libres (dont les espèces du genre *Acanthamoeba* les plus répandues dans l'environnement). Les vésicules intra-amibiennes ont une taille micronique (90 % entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ ) et contiennent des *Legionella* viables (Philippe et al., 2006).

Les légionelles, pour survivre, pénètrent dans ces micro-organismes eucaryotes, en particulier les amibes libres, sont ensuite capables de détourner les systèmes de destruction habituellement mis en place par ces hôtes pour digérer les bactéries, puis se multiplient dans des vacuoles (Bozue and Johnson, 1996) (Figure 2). 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 qui vont être libérées dans l'environnement sous forme d'une vésicule remplie de légionelles, ou sous forme libre par lyse de l'amibe (Figure 3) (Kwaik et al., 1998). Les légionelles vont ainsi pouvoir de nouveau coloniser des biofilms, infecter d'autres amibes ou contaminer l'Homme.

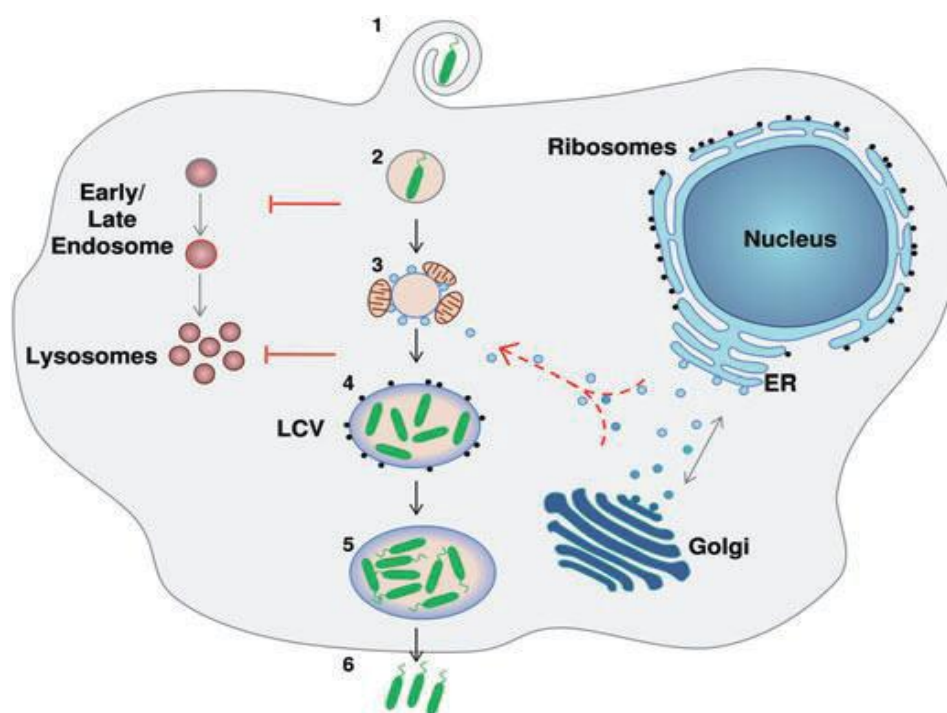


**Figure 2.** Infection d'*Acanthamoeba polyphaga* (B, D, F) et le macrophage U937 (A, C, E) par *L. pneumophila* (Bitar et al., 2004).

Phagocytose (A et B) ; formation du réticulum endoplasmique (RER) entourant le phagosome (C et D) ; dernière étape de l'infection (E et F). Photographie prise à l'aide d'un microscope électronique

En outre, la croissance intra-amibienne de *L. pneumophila* améliorerait sa résistance aux conditions environnementales défavorables (températures élevées, acidité, pression osmotique, biocides, ...) (Kwaik et al., 1998; Philippe et al., 2006; Thomas et al., 2004) et aux antibiotiques tels que la gentamycine (Bouyer et al., 2007). Sutherland and Berk (1996) ont observé que l'utilisation des biocides pour la désinfection des tours aéroréfrigérantes induit l'enkystement des protozoaires. De plus, Berk et al. (1998) ont étudié l'effet de deux biocides sur la production des vésicules respirables contenant *L. pneumophila* chez *Acanthamoebae spp.* Ils ont montré que 24 heures après le traitement, les amibes infectées libèrent des vésicules de taille inférieure à 5 µm contenant entre 20 et 200 *L. pneumophila*. Ces vésicules permettent à *Legionella* de survivre de nombreux mois dans l'environnement (Bouyer et al., 2007), et rendent la bactérie plus résistante à la désinfection (biocides, traitements thermiques...) et plus infectieuse (Kwaik et al., 1998; Barker et al., 1993).

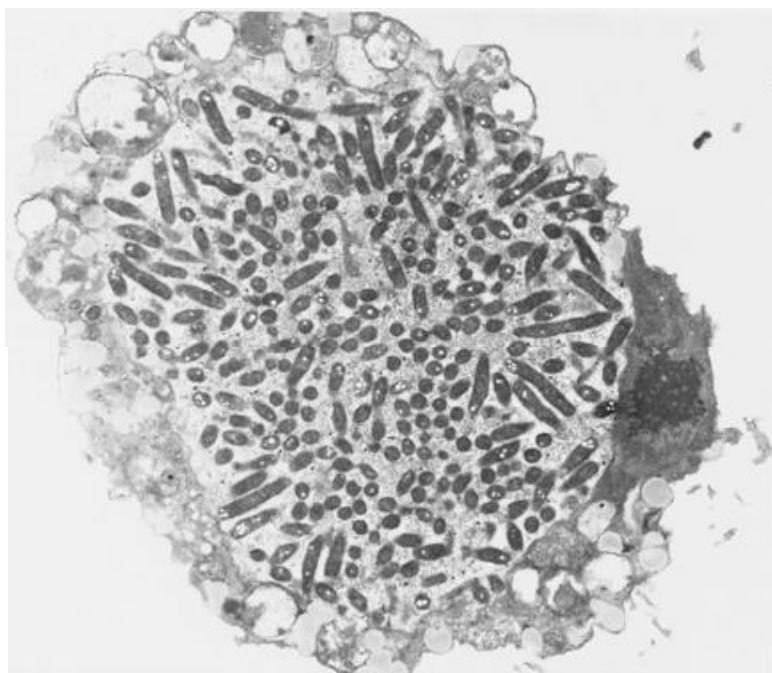
Alors que les interactions entre *Legionella* et les amibes sont bien étudiées, les relations avec le reste de la microflore sont moins bien documentées. Dans une étude en 2009, il a été souligné que *Legionella* interagit probablement avec d'autres eucaryotes présents dans les environnements aquatiques (algues, champignons, etc...) (Taylor et al., 2009a). Excepté en laboratoire, il n'a jamais été observé de croissance extracellulaire de *Legionella* (Fields, 1996).



**Figure 3.** Cycle de vie de *L. pneumophila* dans les protozoaires (Franco et al., 2009).

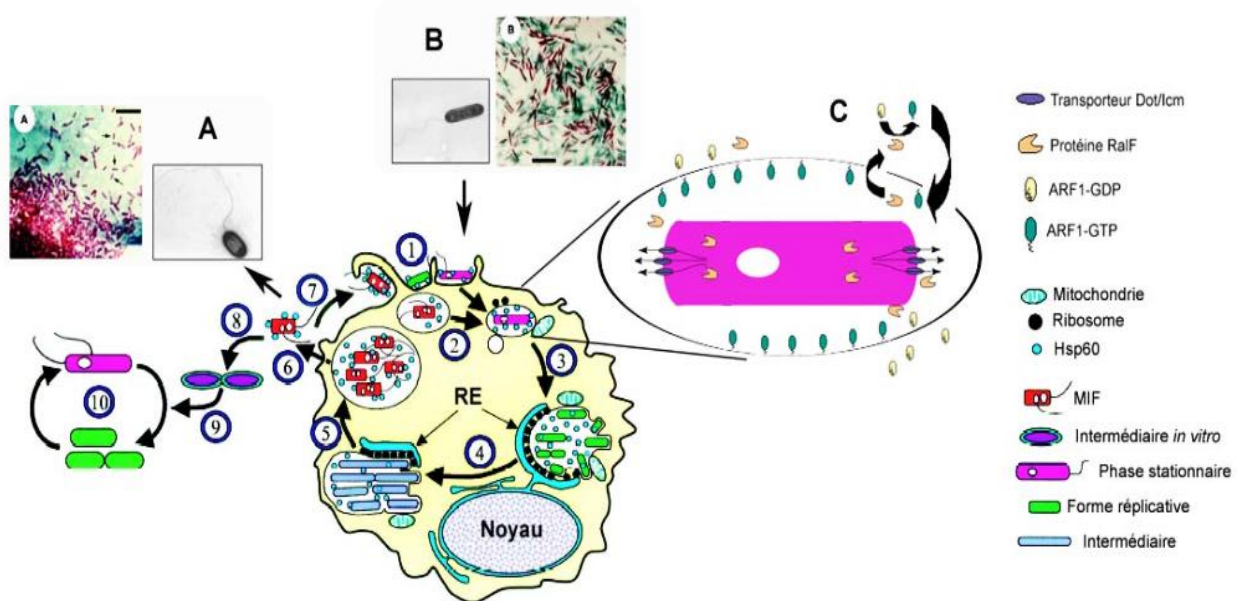
(1) internalisation de *L. pneumophila* par phagocytose, (2) Inhibition de la voie endocyttaire (inhibition de la fusion phagosome-endosome), (3) interaction de la « *Legionella* containing vacuole » (LCV) avec des mitochondries et inhibition de la fusion phagosome-lysosome, (4) recrutement sur la LCV du réticulum endoplasmique et de ribosomes pour former une vacuole répliquative, (5) répliquative de *Legionella* et formation du flagelle et (6) sortie du protozoaire.

Le cycle de vie intracellulaire de *Legionella* suit plusieurs étapes (Figure 3 et 5). La première étape est l'internalisation des *Legionella* par phagocytose. Une fois dans les phagosomes, la bactérie est capable de recruter rapidement des organites (mitochondries, réticulum endoplasmique et ribosomes) afin de former une vacuole répliquative. La bactérie se retrouve alors dans une vacuole censée fusionner avec le lysosome afin d'être digérée. Or, comme d'autres micro-organismes à développement intracellulaire, *L. pneumophila* a la capacité d'échapper à la digestion endosomale de l'hôte (Greenberg et al., 2006) grâce, notamment, au système Dot/Icm, système de sécrétion de type IVB. Par ce biais, la bactérie injecte dans la cellule hôte des facteurs inhibant la voie endocytaire qui permettrait à l'hôte de la détruire (perturbe le trafic vésiculaire et empêchant la fusion du phagosome avec le lysosome) (Coers et al., 1999; Shohdy et al., 2005). La bactérie subit par la suite des changements physiologiques et phénotypiques résultants de son adaptation au milieu intracellulaire (Faulkner and Garduno, 2002; Fernandez-Moreira et al., 2006; Miyake et al., 2006). En effet, la vacuole dans laquelle se trouvent les légionelles devient un compartiment de réplication dans lequel se multiplie jusqu'à épuisement des nutriments, puis dissémine dans l'environnement et infecte une nouvelle cellule-hôte (Figure 4) (nouveau protozoaire, macrophage alvéolaire) (Garduno et al., 2002).



**Figure 4.** Cellule de *Hartmanella vermiformis* infectée par *L. pneumophila*, 12 h après infection (grossissement  $\times 3400$ ) (Kwaik et al., 1998).

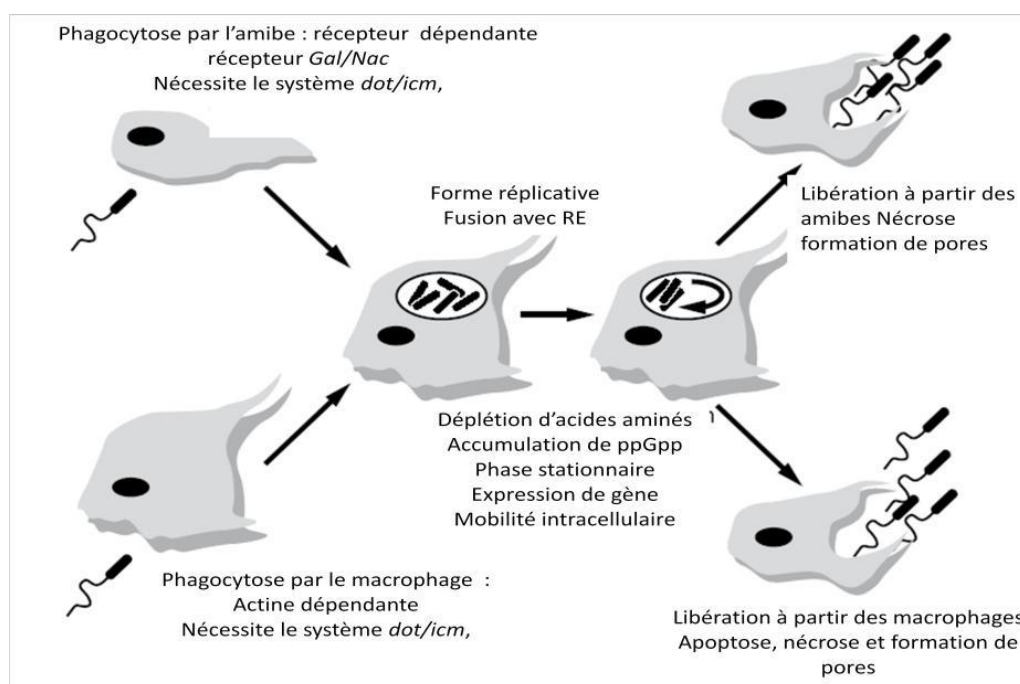
Selon l'hôte phagocytaire, amibe ou macrophage, il existe tout de même certaines différences qui concernent deux étapes du cycle infectieux : la phagocytose et la libération des légionelles. La phagocytose est apparemment « récepteur - dépendante » chez les amibes alors qu'elle est « actine dépendante » chez les macrophages (Fields et al., 2002b). La libération des bactéries après l'infection d'une amibe s'opère par lyse (nécrose) cellulaire et formation de pores membranaires, mais jamais par apoptose (Gao and Abu Kwaik, 2000). Lors de l'infection du macrophage, ce processus s'opère par apoptose et formation de pores membranaires (Figure 5 et 6).



**Figure 5.** Représentation schématique des cycles de croissance intra- et extracellulaire de *L. pneumophila*. D'après (Faulkner and Garduño, 2002; Kahn et al., 2002; Garduno et al., 2002; Dietrich et al., 2001).

- (1) Différents phénotypes de *Lp* peuvent s'attacher et entrer dans la cellule hôte.
- (2) Le phagosome s'associe avec le Reticulum Endoplasmique (RE) pour former le compartiment réplcatif (3)
- (3) Des formes intermédiaires présentant une morphologie distincte apparaissent tandis que la réplcation se poursuit.
- (4) A la fin de la réplcation intra-cellulaire les formes MIFs se différencient et acquièrent un phénotype de virulence maximale.
- (5) Les MIFs sont libérées, extra-cellulaires ou dans des vésicules.
- (6) Les MIFs ou les vésicules remplies de MIFs peuvent entamer un nouveau cycle.
- (7) Les MIFs libérées peuvent aussi initier un cycle de croissance extra-cellulaire après différenciation en une forme intermédiaire réplcatif.
- (8) Les formes intermédiaires se différencient en formes extra-cellulaires à réplcation active.
- (9) pendant le cycle de croissance extra-cellulaire *Lp* alterne entre le phénotype de croissance exponentielle et le phénotype de phase stationnaire.
- (10). A : Aspect du phénotype MIF en coloration de Gimenez et en microscopie électronique à transmission.  
B : Aspect du phénotype en phase post-exponentielle de croissance extra-cellulaire.  
C : Recrutement de ARF1-GTP à la surface cytosolique des membranes des phagosomes grâce à la protéine RalF.

La multiplication intracellulaire des légionelles induit non seulement des changements physiologiques de ces bactéries, telle que la modification du profil des acides gras, et éventuellement des LPS (Barker et al., 1993), mais aussi confère aux bactéries une résistance accrue aux produits chimiques (biocides) (Barker et al., 1992) et aux antibiotiques (Barker et al., 1995), ainsi, l'amplification du pouvoir infectieux bactérien vis-à-vis des macrophages humains et des amibes (Cirillo et al., 1994; Cirillo et al., 1999).



**Figure 6.** Cycle cellulaire de *L. pneumophila* dans les amibes et les macrophages humains (Fields et al., 2002b).

### I.3. Association aux biofilms

Si les protozoaires sont un paramètre essentiel à la multiplication de *Legionella*, les biofilms sont quant à eux la clé de sa persistance dans l'environnement (Borella P et al., 2005). Dans les réseaux d'eaux les biofilms représentent une niche écologique très répandue où *Legionella* survit et peut proliférer (Atlas, 1999; Taylor et al., 2009a) ; ils facilitent les échanges gazeux et nutritionnels et protègent les cellules des conditions hostiles comme par exemple lors d'un traitement biocide (Morton et al., 1998; Abdel-Nour et al., 2013). Cependant, la disponibilité en nutriments, l'hydraulique, la température de l'eau, le type et la concentration du biocide présent dans le réseau ont une influence sur ce biofilm (Norton and LeChevallier, 2000).



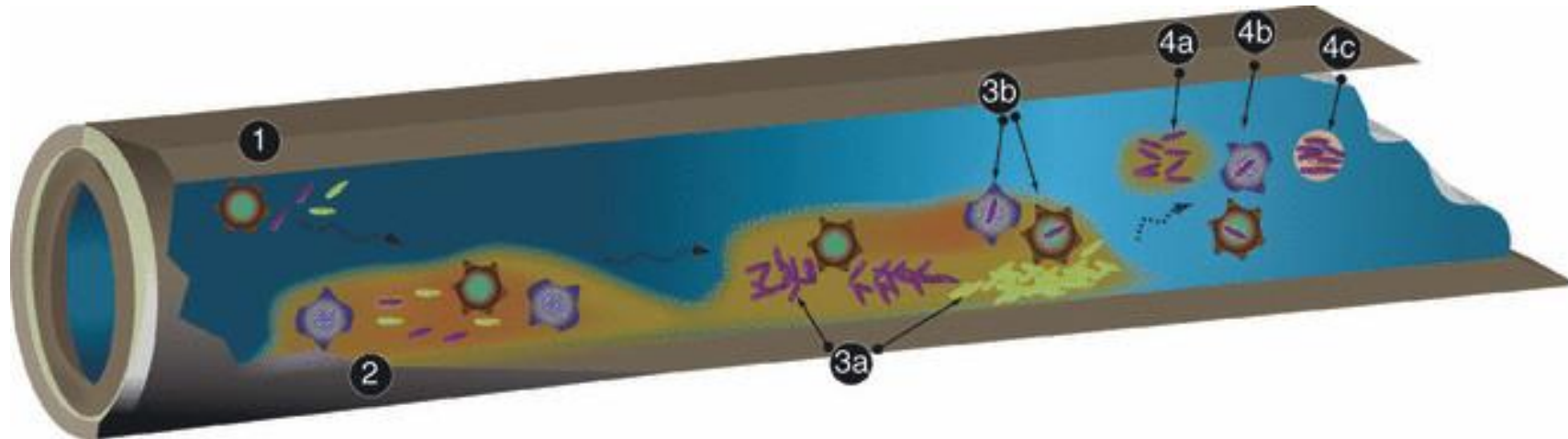
D'après une étude réalisée en 2004, *Legionella* représente moins de 1% de la biomasse totale dans un réseau d'eau domestique, plus de 90% des Légionelles colonisent les biofilms (Thomas et al., 2004). La structure de la population de *Legionella* dans les biofilms subit des modifications, une diminution de la diversité de *Legionella* peut être constatée durant la période de prolifération de *L. pneumophila* (en période estivale) (Wéry et al., 2008). La bactérie est plus facilement retrouvée dans les échantillons de biofilm que dans l'eau circulante (Fields et al., 2002b). En fait, selon certains auteurs, il est estimé que 95% des bactéries présentes dans un réseau d'eau sont au niveau des surfaces, la phase circulante représente seulement 5 % de la biomasse restante (Declerck et al., 2009; Flemming et al., 2002).

Le modèle du développement de *Legionella* dans un réseau d'eau potable proposé par Lau and Ashbolt (2009) fait intervenir des interactions entre les protozoaires du biofilm permettant la réplication et le maintien des *Legionella* dans les réseaux (Figure 7). Declerck et al. (2009) ont indiqué qu'en absence d'amibes aucune augmentation de la population de légionelles associées au biofilm ou de légionelles planctoniques n'est constatée. Le biofilm ne contiendrait pas assez de substances nutritives permettant la croissance de *Legionella* libre, elle n'y ferait que survivre. *Legionella* tire plusieurs avantages à coloniser des biofilms plutôt qu'à rester à l'état planctonique (Davey and O'toole, 2000).

En effet, il existe au sein du biofilm, et entre le biofilm et la phase aqueuse, des systèmes d'échanges qui permettent d'apporter aux microorganismes les nutriments et métabolites nécessaires à leur survie. De plus, plusieurs études ont démontré que le biofilm permet de protéger les *Legionella* des stress environnementaux et des traitements chimiques (Borella P et al., 2005; Cooper and Hanlon, 2010a).

Selon Kuiper et al. (2004), les amibes seraient nécessaires à la multiplication de *L. pneumophila*, le biofilm ne permettant que la survie de la bactérie mais pas sa prolifération, la croissance intracellulaire étant probablement le seul moyen pour *Legionella* pour proliférer dans le biofilm. *L. pneumophila* serait restreint à une vie intracellulaire dans les environnements naturels car inapte à utiliser la cystéine. En effet dans l'environnement, la L-cystéine est rare car rapidement oxydée en L-cystine, un dipeptide et la bactérie ne possède pas de transporteur à L-cystine mais deux transporteurs à la cystéine (Ewann and Hoffman, 2006). Cette faible disponibilité de nutriments dans le biofilm doit « inciter » *Legionella* à entrer en phase planctonique pour parasiter son hôte et proliférer (Taylor et al., 2009a).

Néanmoins, le développement de la microflore environnementale pourrait stimuler le développement des populations de *Legionella* via la dégradation de la matière organique qui y est générée (Stout et al., 1985). Le maintien des populations de légionelles dans les biofilms serait alors possible car *Legionella* est capable de se nourrir de façon nécrotique dans le biofilm (bactéries mortes, protozoaires, microflore) et pourrait également utiliser les cellules des algues pour se nourrir dans les environnements aquatiques (Temmerman et al., 2006a).



**Figure 7.** Développement et relargage de *Legionella* spp. dans un réseau d'eau potable (Lau and Ashbolt, 2009).

*Legionella* spp. ainsi que divers protozoaires entrent dans le système (1) et pénètrent dans le biofilm (2). *Legionella* spp. forme des colonies (3a) ou est ingérée par des protozoaires (3b). *Legionella* est relarguée dans le milieu extérieur associée au biofilm (4a), dans des kystes ou des trophozoites de certains protozoaires (4b) ou dans des vésicules sécrétées par leur hôte (4c)

Lau and Ashbolt (2009) ont décrit également la survie de *L. pneumophila* dans des biofilms métaboliquement inactifs, associée à des cellules microbiennes. Taylor et al. (2013) ont suggéré la persistance de *Legionella* dans un état de dormance dans les biofilms après des périodes de multiplication intracellulaire.

*Legionella* est un pathogène qui s'adapte au milieu aquatique oligotrophe ce qui lui permet de persister sur de longues périodes dans les biofilms et éventuellement de se multiplier, notamment grâce aux amibes (Wingender and Flemming, 2011). Dans les réseaux d'eau, le biofilm est donc un réservoir important de *L. pneumophila*, ce qui implique des opérations de nettoyage et de désinfection appropriées est primordiale afin d'éviter toute contamination ou prolifération anormale.

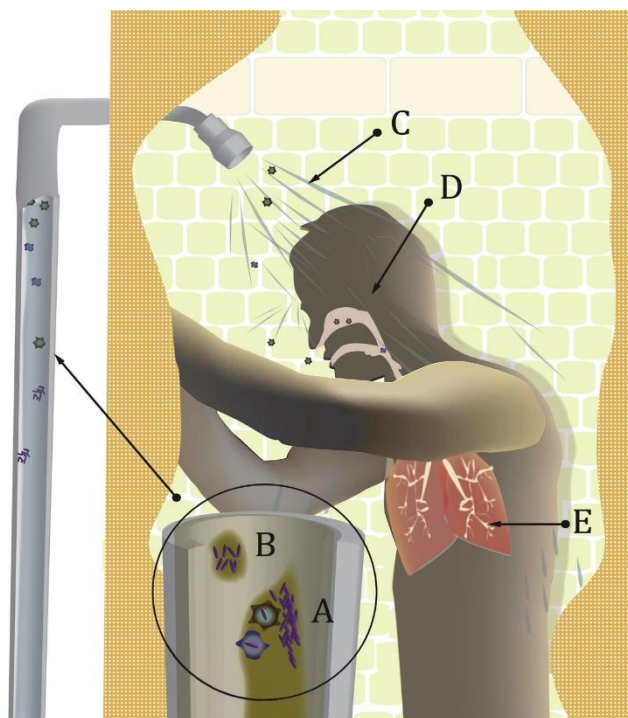
## **I.4. Epidémiologie**

### **I.4.1. Mode de transmission**

*Legionella* est transmise directement de l'environnement à l'Homme. Aucune contamination interhumaine n'a jamais été décrite et aucun réservoir animal n'est actuellement répertorié (Benhamou et al., 2005; Arslan-Aydoğdu and Kimiran, 2018). Bien que l'on ne pense pas que la transmission interhumaine se produise, un cas a été rapporté, ce qui suggère que cette forme de transmission peut exister, mais elle est rare (Correia et al., 2016)

L'inhalation d'aérosols infectieux issus de réservoirs hydriques contenant la bactérie constitue l'unique voie de contamination décrite selon la majorité des auteurs (Fields et al., 2002b; Shah et al., 2018). Les aérosols de 1 à 10 µm peuvent pénétrer dans la région alvéolaire des poumons. Selon Green and Lane (1964), 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 and Morton, 1953). Par ailleurs, ces particules doivent posséder un diamètre supérieur à 2 µm afin de pouvoir contenir une ou plusieurs cellules bactériennes (Baron and 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. Cette voie de transmission était déjà le mécanisme présumé d'infection depuis les années 80 (Baron and Willeke, 1986). Les aérosols ou les microgouttelettes d'eau contaminés sont générés au niveau de points d'eau naturels mais aussi au niveau d'installations développées par les activités humaines telles que les tours aéroréfrigérantes, les climatiseurs, les douches, les fontaines, les spas (Figure 8). Il s'agit donc d'une pathologie dont l'émergence et la dissémination accrue sont liées au développement technologique humain (Atlas, 1999; Barrabeig et al., 2010).

D'après une étude récente, la densité de *Legionella* dans l'air et dans l'eau nécessaire pour entraîner une infection par inhalation d'aérosols de douche a été estimée respectivement entre  $3.5 \times 10 - 3.5 \times 10^3$  UFC/m<sup>3</sup> et  $3.5 \times 10^6 - 3.5 \times 10^8$  UFC/L (Schoen and Ashbolt, 2011). Les facteurs climatiques semblent avoir un rôle dans la dissémination du pathogène, en particulier le taux d'humidité de l'air qui est décrit comme un facteur déterminant dans la persistance et la suspension des aérosols (Hambleton et al., 1983; Mekour et al., 2013b).



**Figure 8.** Modèle conceptuel pour l'exposition à *Legionella* par inhalation d'aérosols de douche contenant des légionelles dérivés de la plomberie in situ des bâtiments (Schoen and Ashbolt, 2011).

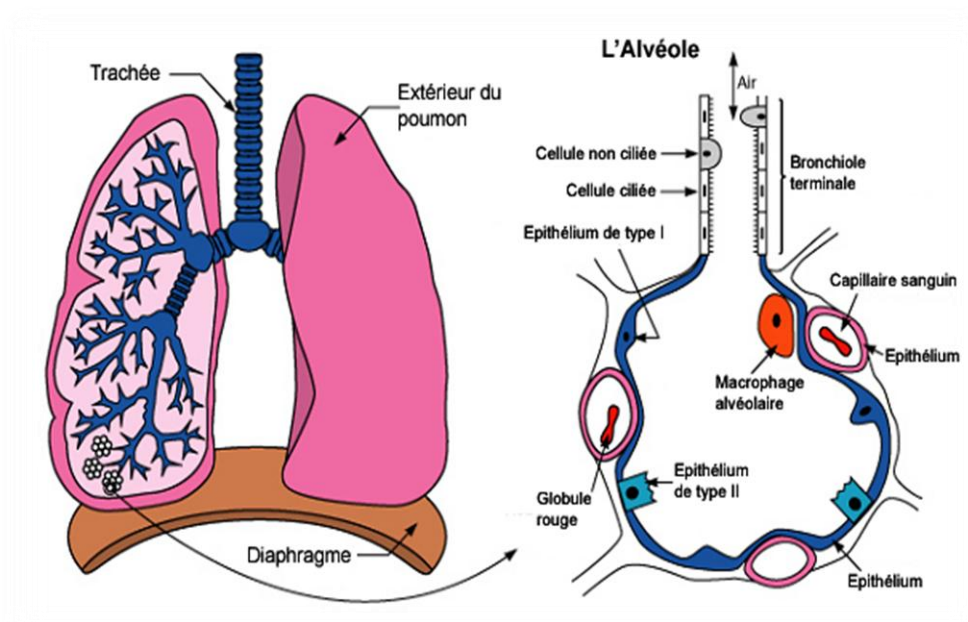
*Tout d'abord, Legionella se multiplie dans le biofilm de plomberie, potentiellement en colonisant le biofilm ou dans un hôte protozoaire (A). La Legionella, associée au biofilm se détache lors d'une douche (B), est transportée à la pomme de douche et est en aérosol (C). Enfin, Legionella aérosolée est inhalée (D) et une fraction de cette dose inhalée est déposée dans la région alvéolaire des poumons (E).*

#### I.4.2. Pathologie

Selon des études épidémiologiques, *Legionella* est une bactérie pathogène opportuniste (Steinert et al., 2002), sa virulence est liée à sa capacité à se multiplier dans les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires de type I et II. Les particules infectieuses de taille inférieure à 8 µm parviennent jusqu'aux alvéoles pulmonaires, elles peuvent être constituées de légionelles libres, de vésicules amibiennes remplies de légionelles (Berk et al., 1998) ou encore d'amibes contaminées (Brieland et al., 1997b; Brieland et al., 1997a). L'épithélium des alvéoles est constitué en majorité de cellules de type I qui couvrent 90% de la surface alvéolaire et interviennent dans les échanges gazeux.

Elles forment une barrière de protection pour les capillaires (Figure 9). Ce sont ces cellules ainsi que les macrophages alvéolaires qui sont la cible de l'invasion par *Legionella* (Gao and Kwaik, 1999; Alli et al., 2000).

La capacité de *Legionella* à infecter les poumons est probablement la conséquence d'une pression de sélection appliquée par les amibes dans l'environnement (Swanson and Hammer, 2000). Les deux principales espèces de *Legionella* pathogènes pour l'Homme sont *L. pneumophila* et *L. longbeachae* (Whiley and Bentham, 2011).



**Figure 9.** Schéma simplifié de l'appareil pulmonaire et des bronchioles (Thomas, 2004).

*Legionella* pénètre dans la cellule par phagocytose (Atlas, 1999) ; une fois phagocytée, elle réside dans un phagosome unique entouré par un réticulum endoplasmique rugueux (RER), véritable réserve de nutriments. Quelques heures après l'infection, le phagosome évolue en s'entourant d'une membrane multicouche issue du RER. La bactérie se multiplie alors dans ce phagosome. Puis en carence nutritionnelle, *Legionella* passe en phase stationnaire où elle exprime plusieurs gènes de virulence permettant à la fois sa libération et transmission vers une nouvelle cellule hôte (Jules and Buchrieser, 2007; Cianciotto, 2001; Kwaik et al., 1998).

Les infections dues à *Legionella* donnent lieu à trois formes de maladie selon la gravité : une forme bénigne appelée fièvre de Pontiac et une forme plus sévère correspondant à la légionellose, qui peut évoluer chez certains patients en infections extra-pulmonaires (Palusińska-Szys and Cendrowska-Pinkosz, 2009).

- **La fièvre de Pontiac**

C'est une maladie bénigne, sans atteinte pulmonaire (Il n'apparaît pas de pneumonie). Les symptômes cliniques majeurs se rapprochent de ceux d'une grippe, les patients atteints présentent un syndrome pseudo-grippal, accompagné de fortes fièvres, de céphalées, de myalgies, des étourdissements, des douleurs musculaires, de frissons, parfois de vertiges et d'une sensation de malaise général, non évolutive et de courte durée (Bartram, 2007; Benhamou et al., 2005; Tossa et al., 2006). Le temps d'incubation est de 1 à 2 jours, 95% des personnes contaminées par la bactérie développent ce syndrome, il n'y a ni décès ni complications graves, la guérison étant spontanée au bout de 2 à 8 jours (Tossa et al., 2006). La première épidémie caractérisée a touché 144 travailleurs ou visiteurs d'un centre médical à Pontiac, dans le Michigan (USA) en 1968 (Glick et al., 1978).

La fièvre de Pontiac peut se définir sur des critères à la fois cliniques et environnementaux (Burnsed et al., 2007) ; les critères environnementaux reposent sur la détection d'une concentration de *Legionella* supérieure ou égale à  $10^3$  bactéries par litre d'eau prélevée au site de la contamination. Cette maladie peut être causée par différentes espèces de *Legionella* : *L. anisa*, *L. feeleeii*, *L. micdadei* et *L. pneumophila* (Wang et al., 2019; Palusińska-Szys and Cendrowska-Pinkosz, 2009).

- **La maladie des Légionnaires**

La légionellose est une pneumopathie atypique aiguë, plus sévère que la fièvre de Pontiac, qui survient principalement chez les personnes à risques ; à savoir les personnes âgées, les grands fumeurs, les alcooliques, les individus atteints par une maladie chronique (diabète, maladie cardiaque) ou s'ils sont immunodéprimés (cancer, hémopathie, traitements immunosuppresseurs, corticoïdes) (Hilbi et al., 2010), elle représente 0,5 à 5 % des pneumopathies communautaires (hôtels, immeubles, spas ou encore associées à des émissions extérieures à partir de tours aéroréfrigérantes) et moins de 0,1% des infections nosocomiales (Pécastaings, 2010).

La maladie est parfois mortelle (7 à 24 %), en fonction de l'âge des patients et de leur état d'immunodépression (Steinert et al., 2002). La durée d'incubation varie de 2 à 10 jours, puis les signes cliniques s'installent sur 2 à 3 jours et associent une asthénie, une fièvre, des céphalées, des myalgies, une toux non productive. Des troubles digestifs et neurologiques peuvent être associés, et certaines complications graves peuvent survenir (insuffisance respiratoire, insuffisance rénale aiguë, rhabdomyolyse...). La rapidité de mise en place et l'efficacité d'un traitement thérapeutique joue un rôle crucial dans le pronostic de cette infection (Jarraud et al., 2007).

Toutefois, des concentrations-seuil acceptables ont été définies : les réseaux d'eau chaude sanitaire doivent présenter des concentrations en *L. pneumophila* inférieures à 1000 UFC/L. Cependant, les secteurs à risque des établissements de santé ainsi que les établissements thermaux, des concentrations en *Legionella* dont *L. pneumophila* inférieures au seuil de détection, soit à 50 UFC/L (DGS, 2013).

Néanmoins, Il est difficile de distinguer cette maladie des autres formes de pneumonie : 1 à 13% des pneumonies seraient associées à cette bactérie en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis (Steinert et al., 2002). *L. pneumophila* est responsable de 91,5% des cas de légionellose avec une prévalence pour *L. pneumophila* du sérotype 1 de 84,2% alors que les sérogroupes 2 à 15 représentent seulement 7,4%, les autres espèces de légionelles complètent l'ensemble (Mondino et al., 2019).

- **Les légionelloses extra-pulmonaires**

Bien que cette maladie soit généralement localisée au niveau des poumons, en l'absence de traitement antibiotique, *L. pneumophila* est capable de migrer hors des poumons et d'infecter d'autres organes principalement : le cœur (myocardite, péricardite ou endocardite), les yeux (rétinite), les tissus adipeux, le système digestif (péritonite, colite nécrosante, pancréatite), les reins et le système musculaire (Megarbane et al., 2000; McConkey et al., 2006; Han et al., 2010). Ces formes extra-pulmonaires conduisent très souvent à la mort du patient (Palusińska-Szys et al., 2009).

#### **I.4.3. Les facteurs de risque**

Les populations les plus sensibles à la légionellose sont les personnes âgées (plus 50 ans), ainsi que les personnes immunodéprimées (cancer, hémopathie, traitements immunosuppresseurs, corticoïdes), bien que la légionellose puisse survenir chez des personnes apparemment en bonne santé et de tout âge (Borella P et al., 2005; Brady and Sundareshan, 2019). Les autres facteurs de risques individuels sont le sexe masculin (3 malades sur 4 sont des hommes), le tabagisme, l'alcoolisme, le diabète et les maladies du système respiratoire et cardiovasculaire (Benhamou et al., 2005; Mondino et al., 2019).

#### **I.4.4. Surveillance épidémiologique**

Au niveau nationale, le Maroc ne dispose pas des moyens pour faire le diagnostic appropriés ou de systèmes de surveillance de la légionellose permettant de décrire la situation épidémiologique. Même au niveau des centres hospitaliers universitaires de Rabat et de Casablanca n'ont pas les moyens pour faire le diagnostic.

L'organisation mondiale de la santé affirme que l'incidence de la légionellose est en hausse et se situe actuellement aux environs de 70 cas par million d'habitants, avec un grand nombre de pays comme le Maroc, à défaut de diagnostic et absence des systèmes de surveillance, la situation reste inconnue.

A l'échelle européenne, la surveillance de la légionellose est effectuée par le réseau ELDSnet (*European Legionnaires Disease Surveillance Network*) puis coordonnée par le ECDC (*European Centre for Disease prevention and Control*). D'après leurs données, 6 305 cas ont été recensés en 2010, correspondant à un taux d'incidence de 1,2 pour 100 000, et engendrant le décès d'environ 500 Européens (Beaute et al., 2013), alors qu'en 2014, 6 943 cas ont été signalés, correspondant à un taux

d'incidence de 1,4 pour 100 000 habitants. Cette augmentation s'explique en partie par la grande épidémie communautaire au Portugal et par un nombre accru de cas liés au voyage au sein du réseau.

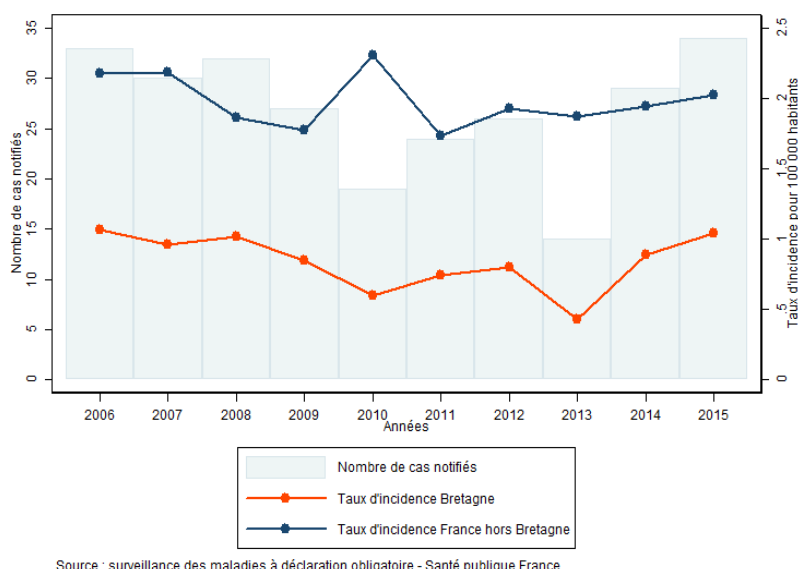
Le nombre de cas de légionellose n'est pas constant tout au long de l'année, une saisonnalité des cas est observée. En France, pour la période de 1998 à 2008, 50% des cas ont lieu durant les 4 mois d'été de juin à septembre (Campese et al., 2011a). Au niveau Européen, durant la période 2009-2010, 59% des cas sont survenus entre les mois de juin et d'octobre, une recrudescence du nombre de cas en période estivo-automnale est observée (Beaute et al., 2013). Cette période correspond au moment où les eaux sont les plus échauffées, et les humains plus exposés de part des activités récréatives et les usages de l'eau.

D'après les données Françaises en 2006 issues des déclarations elles font état de 1443 cas de légionelloses déclarées, représentant une incidence de 23 cas par million d'habitants. Ce nombre est inférieur à celui de 2010 de 1540 cas de légionellose ont été enregistrés correspondant à un taux d'incidence de 24 cas par million d'habitants, soit une augmentation de 28 % par rapport à 2009 (Campese et al., 2011b). L'Institut de veille sanitaire estime par ailleurs que de nombreux cas ne sont pas diagnostiqués du fait d'un tableau clinique peu évocateur et d'une évolution rapide vers la guérison. La létalité est de 12% (159 décès en 2010). les légionelloses nosocomiales ne représentent pas plus de 6 à 7% des cas de légionellose en France, tandis que plus de 90 % des cas sont liés à des expositions en milieu communautaire (Campese et al., 2011b).

Les investigations épidémiologiques et environnementales réalisées suite à ces cas groupés ont mis en cause la contamination de tours aéroréfrigérantes (TARs) par des légionelles (Paris 1998, Lens 2003-2004, Paris 2006, Nice 2007...), les autres sources de contaminations incriminées dans les épidémies sont les circuits de distribution d'eau chaude sanitaire (douches), les systèmes de climatisation et les eaux thermales chaudes. Ces installations constituent en effet des habitats favorables où les légionelles se multiplient préférentiellement à des températures comprises entre 25 et 42°C (O'Neill and Humphreys, 2005).

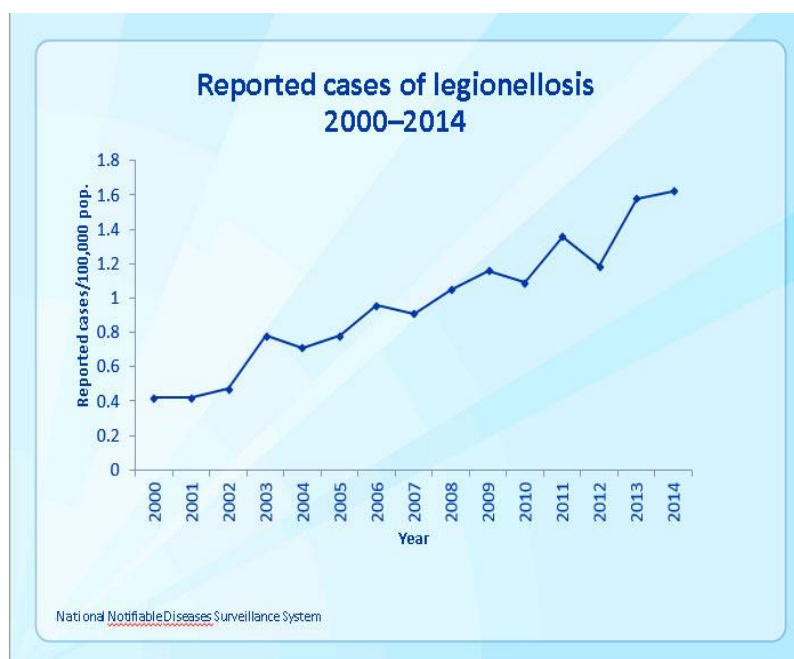
En 2015, 34 cas de légionellose ont été notifiés en Bretagne. Le taux d'incidence des cas notifiés était de 1,0/100 000 habitants (Figure 10). Le nombre de cas en 2015 est légèrement supérieur à celui de 2014 où 29 cas avaient été notifiés en Bretagne et 1 348 cas en France.





**Figure 10.** Evolution du nombre de cas et du taux d'incidence de la légionellose en France et en Bretagne, 2006-2015 (InVS, 2016).

D'après l'Agence de Santé Publique au Canada, la prévalence de la légionellose est d'environ 75 cas signalés chaque année, ce qui équivaut à 1 à 3 cas pour 1 million de personnes (Reimer et al., 2010). Le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) a estimé que plus de 25 000 cas de maladie sont recensés chaque année aux États-Unis uniquement, provoquant plus de 4000 morts (Figure 11) (CDC, 2016).



**Figure 11.** Augmentation des cas de légionellose de 286% pour 100 000 habitants durant la période 2000-2014 aux États-Unis (CDC, 2016)

La surveillance a donc pour objectifs :

- Au niveau local, 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 de contrôles appropriées ;
- Au niveau national, de connaître la fréquence, les tendances et les principales caractéristiques épidémiologiques des cas de légionellose et d'identifier des cas groupés ;
- Au niveau mondial, de détecter des cas groupés pouvant être rattachés à une source commune d'exposition lors d'un voyage, afin de prendre les mesures de préventions nécessaires.

Les modèles d'évaluation de la sensibilité de *L. pneumophila* aux antibiotiques sont peu corrélés avec les données épidémiologiques disponibles. Ces modèles permettent en effet de mesurer l'effet des antimicrobiens sur des bactéries extracellulaires, alors que lors de l'infection, les bactéries sont protégées à l'intérieur des macrophages (Pedro-Botet and Yu, 2006). Ce sont donc des antibiotiques capables d'atteindre des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) intracellulaires efficaces qui sont à privilégier dans le traitement des légionelloses, notamment les macrolides (kétolides et azalides ; bactériostatiques) – inhibiteurs de la synthèse protéique par fixation sur la sous-unité 50S ribosomale et les fluoroquinolones (bactéricides) – inhibiteurs de la synthèse d'ADN par fixation sur l'ADN-gyrase. La rifampicine est également utilisable, mais jamais en monothérapie (De Giglio et al., 2015b).

L'érythromycine a longtemps été le traitement de référence, mais l'azithromycine et la clarithromycine, ayant une meilleure activité intracellulaire, sont de plus en plus privilégiées. Les fluoroquinolones, dont l'activité intracellulaire est supérieure à celle des macrolides, semble permettre une meilleure réponse thérapeutique (Pedro-Botet and Yu, 2006). L'association d'une fluoroquinolone (notamment la lévofloxacine) à un macrolide est utilisée pour le traitement de légionelloses sévères ou touchant des patients immunodéprimés (Jarraud et al., 2000).

Une étude menée par De Giglio et al. (2015) a montré que l'ensemble des souches étudiées sont inhibées par de faibles concentrations des fluoroquinolones et les macrolides. Rifampicine est l'antibiotique le plus actif contre les bactéries de *Legionella* in vitro. Cependant, Sikora et al (2014) ont rapportés la résistance à l'Azithromycine d'une souche environnementale de *L. pneumophila* sg2-14 isolée à partir du système d'eau. A part cela, aucun mécanisme de résistance spécifique n'a été identifié pour ces antibiotiques, mais on note tout de même des échecs thérapeutiques (Jarraud et al., 2000), le plus souvent liés à l'administration tardive du traitement et à la gravité de l'infection.

## I.5. Virulence chez *Legionella*

La virulence s'exprime au travers des facteurs phénotypiques ou génomiques qui peuvent aussi être influencés par l'environnement : ce sont des facteurs de surface, de sécrétion et déterminants périplasmatiques et cytosoliques.

### I.5.1. Facteurs de virulence et structures de la surface bactérienne

Une majorité des facteurs de virulence font partie de la surstructure bactérienne ; ces structures moléculaires de l'interface de *L. pneumophila* comme les protéines MOMP, Mip et Hsp60, les pili, les flagelles et les lipopolysaccharides ont un rôle déterminant dans le contrôle des phénomènes d'adhésion et de formation de biofilm ainsi que la virulence et le processus infectieux de *Legionella* (Cianciotto, 2001; Heuner et al., 2002) :

- **Les lipopolysaccharides (LPS)** qui recouvrent la surface des légionelles jouent un rôle important dans l'adhésion de *Legionella* à la muqueuse respiratoire et aux surfaces inertes. Les LPS sont les déterminants immunogéniques les plus importants qui confèrent la spécificité du sérotype. Les LPS possèdent une chaîne homopolysaccharide spécifique (Antigène O) d'un dérivé 5-N acétimidoylé et 7-N-acétylé de l'acide légionaminique. Le caractère très hydrophobe des LPS renforcerait la virulence des légionelles (Steinert et al., 2002).

- **La protéine MOMP (Major Outer Membran Protein)**, codée par le gène *ompS*, est une porine associée au peptidoglycane, capable de s'insérer dans les membranes des cellules hôtes et d'ouvrir des canaux qui vont permettre le passage d'ions (Dowling et al., 1992; Gabay et al., 1985). Cette protéine se lie également aux récepteurs du complément CR1 et CR3 qui se trouvent à la surface des monocytes humains, favorisant l'attachement de la bactérie à la cellule hôte (Steinert et al., 2002).

- **Les pili de type IV** (0,8 à 1,5  $\mu$ m) synthétisés par *L. pneumophila* interviennent dans un mécanisme d'attachement à la cellule hôte (Donlan, 2002; Söderberg et al., 2004). L'étude d'un mutant déficient pour la synthèse de ces pilis de type IV montre que l'adhérence aux cellules épithéliales HeLa, aux macrophages U937 et à *Acanthamoeba polyphaga* est diminuée de 50%. La biosynthèse de ces pilis semble contrôlée par la température car la « piliation » des légionelles est beaucoup plus importante à 30°C qu'à 37°C. Il est aussi important de souligner que ces pilis sont également associés au transfert d'ADN dans le cadre des mécanismes de compétence naturelle observés chez *L. pneumophila* *sg 1* Philadelphia (Stone and Kwaik, 1999).

- **La protéine de choc thermique de 60kDa (Hsp60)** : La biosynthèse de cette protéine (« Heat shock protein », 60Kda) est induite pendant la croissance dans les macrophages et, in vitro, en réponse au peroxyde d'hydrogène, à la chaleur et au choc osmotique. Hsp60 serait également impliquée dans l'attachement et l'entrée de *Legionella* dans les cellules épithéliales HeLa (Garduño et al., 1998a);

- **La protéine Mip (Macrophage infectivity potentiator)** : codée par le gène *mip*, est une protéine de 24 kDa exprimée à la surface des *L. pneumophila*, qui est nécessaire pour les premières étapes d'infection intracellulaire des cellules hôtes (Cianciotto, 2001). Cette protéine possède une activité peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase (PPIase) (Steinert et al., 2002).

- **les Flagelles** : le gène de la flagelline est régulé par la température (augmentation lorsque la bactérie est cultivée à 30°C plutôt qu'à 37°C ou 41°C), la phase de croissance, les acides aminés, la viscosité ou la pression osmotique. Bien que les flagelles de *Legionella* ne soient pas nécessaires à la réplication intracellulaire, ils confèrent une mobilité aux légionelles, augmentant ainsi les probabilités de rencontre avec les amibes et la capacité d'invasion de la bactérie (Vogel and Isberg, 1999). Les flagelles interviennent aussi dans le phénomène d'adhésion aux surfaces (Dietrich et al., 2001; Oder et al., 2015).

### I.5.2. Les systèmes de sécrétion

Les légionelles sont capables d'entrer dans la cellule hôte sans être détruites afin de s'y multiplier. Ceci est rendu possible par de nombreux systèmes de sécrétion pour le transport de molécules à travers la membrane externe : le système de type II, Lsp, le système de type IVB, Icm/Dot, et le système de type IVA, Lvh. Deux systèmes putatifs ont également été identifiés : le système de type I, et un système de type V, identifié chez la souche Paris (De Buck et al., 2007):

- **Le système de sécrétion de type I** est un système permettant le transport de protéines à travers les 2 membranes en une seule étape.
- **Le système de sécrétion de type II** de *L. pneumophila* est impliqué dans la croissance et la survie de la bactérie à basse température, dans les amibes et dans les macrophages. Les protéines sécrétées sont d'abord transloquées à travers la membrane interne puis dans le périplasme. Un pseudopilus pousse ensuite les protéines à travers un pore de la membrane externe (sécrétine).
- **Les systèmes de type IV** : Deux systèmes de sécrétion de type IV coexistent chez *L. pneumophila* : un système de type IVA ; le système Lvh (*Legionella vir* homologues) et un système de type IVB ; le système Icm/Dot (Intracellular multiplication/Defective organelle trafficking) :
  - ✓ **Le système de type IVA** : Le système de type IVA est nécessaire pour l'infection de la cellule hôte ainsi que la croissance à 30°C, ce qui suggère un rôle dans la survie dans l'environnement (De Buck et al., 2007).
  - ✓ **Le système dot/icm** : Joue un rôle primordial dans la virulence de *L. pneumophila*. Il est Composé de 25 gènes. Ces groupes de gènes, situés sur deux régions distinctes du chromosome bactérien, ont été identifiés indépendamment par deux équipes (Marra et al., 1992; Berger and Isberg, 1993). Ils codent pour un appareil de sécrétion de type IV qui constitue, d'après Lammertyn and 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 (Christie and Vogel, 2000; Christie, 2001; Segal et al., 1999a).

### **I.5.3. Autres facteurs de virulence**

De nombreux autres facteurs peuvent intervenir dans la virulence chez *Legionella* sans qu'on en connaisse véritablement le rôle. On peut citer les gènes *mip* (*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 (Kwaik, 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.

## Chapitre II. Méthodes de détection et de caractérisation moléculaire et physicochimique de *Legionella*

La mise en évidence d'une contamination par *Legionella* est un enjeu majeur pour la santé publique, d'une part pour assurer un traitement approprié aux patients atteints de légionellose et d'autre part pour traiter les installations contaminées et/ou prévenir d'autres contaminations éventuelles de l'environnement. Différentes techniques, de natures microbiologique, moléculaire et biochimique, existent pour détecter les bactéries du genre *Legionella* dans l'environnement et au niveau clinique chez un patient. Elles impliquent la mise en culture et la mise en évidence de marqueurs moléculaires et biochimiques spécifiques des souches de *Legionella*.

### I. Méthodes classiques de culture

Les méthodes de culture sur milieu gélosé sont classiquement utilisées en routine, et sont les méthodes historiquement mises en place pour la recherche et le dénombrement du pathogène. De par ses caractéristiques biochimiques (acides aminés comme principale source de carbone), *Legionella* est une bactérie dont la croissance nécessite des éléments spécifiques. Le milieu de culture utilisé est le BCYE (*Buffer Charcoal Yeast Extract*) mis au point après l'épidémie de 1976 par Feeley (Feeley et al., 1979). L'extrait de levure constitue le substrat nutritif, le charbon actif décompose le peroxyde d'hydrogène, le tampon ACES permet le maintien du pH. L'emploi d' $\alpha$ -cétoglutarate est décrit comme un activateur de la croissance de *Legionella*, cependant il n'est pas toujours employé. Les conditions optimales de croissance de *Legionella* sont un pH de 6,9 et une température de 36°C (Feeley et al., 1979), mais la gamme de température de croissance s'étend de 25 à 42°C (Fields et al., 2002b).

Un milieu sélectif, le GVPC (Glycine, Vancomycine, Polymyxine B, Cycloheximide) est recommandé pour l'isolement des *Legionella* spp. à partir d'échantillons d'eau et de l'environnement. La vancomycine et la polymyxine inhibent la croissance des bactéries à Gram positif et celle de la plupart des Gram négatif. Le cycloheximide a été incorporé au mélange du fait de sa plus grande activité sélective vis-à-vis des champignons par rapport à l'anisomycine qui est presque exclusivement active contre les levures. Un prétraitement chimique à pH 2,2 et/ou un choc thermique de 30 min à 50°C sont appliqués au préalable pour éliminer une partie de la flore totale de l'échantillon.

Un test immunologique basé sur la réaction anticorps-LPS (Lipopolysaccharide) peut être ensuite utilisé afin de confirmer l'appartenance de la colonie testée au genre *Legionella*. La détermination du sérotype (sérotype 1 ou sérotypes 2 à 15) est également possible par ce test.

### II. Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes basées sur la biologie moléculaire se sont développées au cours des dernières années, ces méthodes sont la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la PCRq (*Quantitative Polymerase Chain*

*Reaction*) et la méthode FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). L'avantage de ces méthodes est double ; elles permettent de fournir un résultat plus rapide (quelques heures au lieu de dix jours pour la culture) et sont souvent plus spécifiques que la culture. Par ailleurs, en culture, le fait que toutes les bactéries ne soient pas cultivables associé aux pertes engendrées par les étapes de centrifugation et de filtration font qu'au final, seuls 10 à 30% des bactéries initiales de l'échantillon sont détectées (Ballard et al., 2000). Les méthodes de biologie moléculaire peuvent limiter les sous-estimations lors des quantifications dues aux bactéries non cultivables voire éviter les pertes dues aux étapes de concentration.

La méthode PCR pour *Legionella* a été décrite la première fois par Mahbubani et al. (1990), les amorces employées ciblaient une région de l'ADN de la sous-unité ribosomique 5S. Pour *L. pneumophila* la cible a été le gène *mip* (Mahbubani et al., 1990), le rôle de ce gène est abordé dans le chapitre précédent. L'année suivante, une méthode de PCR dont l'objectif est de faire la distinction entre cellule viable et non viable a été mise au point par Bej et al. (1991). La technique est basée sur la synthèse d'un ADNc complémentaire à l'ARNm *mip* spécifique de *L. pneumophila* viable (Bej et al., 1991). La détection de *Legionella* par PCR a été utilisée dans plusieurs études effectuées sur différents types d'eaux : eaux de réseaux domestiques, eaux de fontaines, eaux de TAR industrielles ou d'hôpitaux (Buchbinder et al., 2002; Miyamoto et al., 1997; Ng et al., 1997). La méthode s'avère plus sensible que la culture, *Legionella* est détectée dans 90% des échantillons. Mais la méthode apporte peu d'information sur le risque sanitaire puisque la quantification n'est pas possible. De plus, dans les environnements naturels, où de faibles quantités de nutriments sont disponibles ou lors de conditions particulières, comme par exemple lors de traitements chimiques, *Legionella* peut être rencontrée sous forme VBNC (*Viable But Not Cultivable*) (Alleron et al., 2008; Steinert et al., 2007), cet état particulier (bactéries vivantes mais non cultivables) a été mis en évidence par Hussong et al. (1987) qui sont les premiers à constater une absence de détection par culture de *L. pneumophila* viables préalablement placées à 4°C pendant 29 jours (Hussong et al., 1987). Cet état entraîne une sous-estimation des populations de *Legionella* par culture, une étude en 2007 indique un taux de détection de *Legionella* spp. dans des installations de réseaux d'eau potable de 2,2% par culture et de 87,1% par PCR (Diederer et al., 2007).

L'avantage de la méthode PCRq par rapport à une simple PCR est de pouvoir quantifier les bactéries et non plus seulement de les détecter. Les amorces utilisées en PCRq ont les mêmes cibles que celles de la PCR à savoir le gène *mip* pour *L. pneumophila* et un gène de la sous-unité ribosomique pour *Legionella*. Joly et al. (2006) décrivent des amorces de PCRq en utilisant, pour leur cas, des amorces qui ciblent un gène de la sous-unité ribosomique 16S pour la quantification des *Legionella* (Joly et al., 2006). D'après Yaradou et al. (2007), la PCRq peut être utilisée pour suivre la contamination en *L. pneumophila*. Néanmoins, la présence d'inhibiteurs de PCR dans certaines eaux engendre de faux négatifs. De plus, cette PCR quantifie les bactéries mortes et vivantes ce qui rend difficile l'évaluation du risque sanitaire. Pour améliorer ce point, plusieurs auteurs ont recommandé l'utilisation de bromure d'éthidium

monoazide ou de propidium monoazide, molécule qui se lie de façon covalente à l'ADN et qui pénètre seulement dans les cellules à la viabilité membranaire altérée empêchant ainsi la quantification des bactéries mortes (Delgado-Viscogliosi et al., 2009; Yanez et al., 2011) ; on parle alors de PCRq-viable. La méthode possède deux avantages : elle minimise les faux positifs dus à la présence de bactéries non viables et fournit des résultats rapidement. Cependant, des étapes de validation sont encore nécessaires avant d'utiliser cette méthode.

L'autre méthode de biologie moléculaire qui permet une détection spécifique des cellules microbiennes sans étape de culture est la méthode FISH. La méthode permet la visualisation de la bactérie directement dans son habitat ou dans des tissus. Grimm et al. (1998) sont les premiers à décrire une sonde (LEGPNE 1) qui cible un domaine variable de l'ARN 16S de *L. pneumophila*. La détection de *L. pneumophila* extra ou intracellulaire est alors possible (Grimm et al., 1998).

Les différentes méthodes de culture restent actuellement les méthodes de référence pour la recherche et le dénombrement des légionelles lors des contrôles des installations. La norme NF T 90-431, qui décrit la méthode pour la recherche et le dénombrement de *Legionella* spp. et de *L. pneumophila* s'applique à toutes les eaux propres et les eaux sales (eaux industrielles par exemple), est basée sur la méthode de culture sur GVPC. Néanmoins, une méthode normalisée pour la PCRq, la norme NF T90-471, a également été mise en place en avril 2010. Le Tableau I synthétise les avantages et les inconvénients des 2 méthodes. Les résultats obtenus par ces 2 méthodes sont difficiles à corréler. Les résultats des dénombrements par PCRq fournissent souvent des concentrations plus élevées que celles obtenues par la méthode de culture, en partie par le fait que les *Legionella* mortes sont dénombrées par PCRq.

**Tableau I.** Comparaison des méthodes de culture et de PCRq (d'après le rapport de l'ANSES 2011, méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau)

Méthodes	Culture	PCRq
Quantification de <i>L. pneumophila</i>	+	+
Quantification de <i>L. pneumophila</i> avec distinction séroroupe 1	+	+
Prise en compte des <i>Legionella</i> intra-amibienne ou intra-vésiculaires	-	+
Non détection des <i>Legionella</i> mortes	+	-
Détection de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes	-	+
Rapidité des résultats	-	+
Critères d'interprétation pour le risque sanitaire disponibles	+	-
Application sur des échantillons traités	+	+
Distinction et quantification des sérogroupes <i>L. pneumophila</i> autre que sg1	+	?
Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp	+	+
Application sur des échantillons d'eaux chargées	-	-
Faisabilité, simplicité	+	+
Equipements nécessaires faibles	+	+
Temps technicien faible	-	+
Interprétation technique des résultats bruts simples	+	+
Permet de disposer des souches pour des études complémentaires	+	-

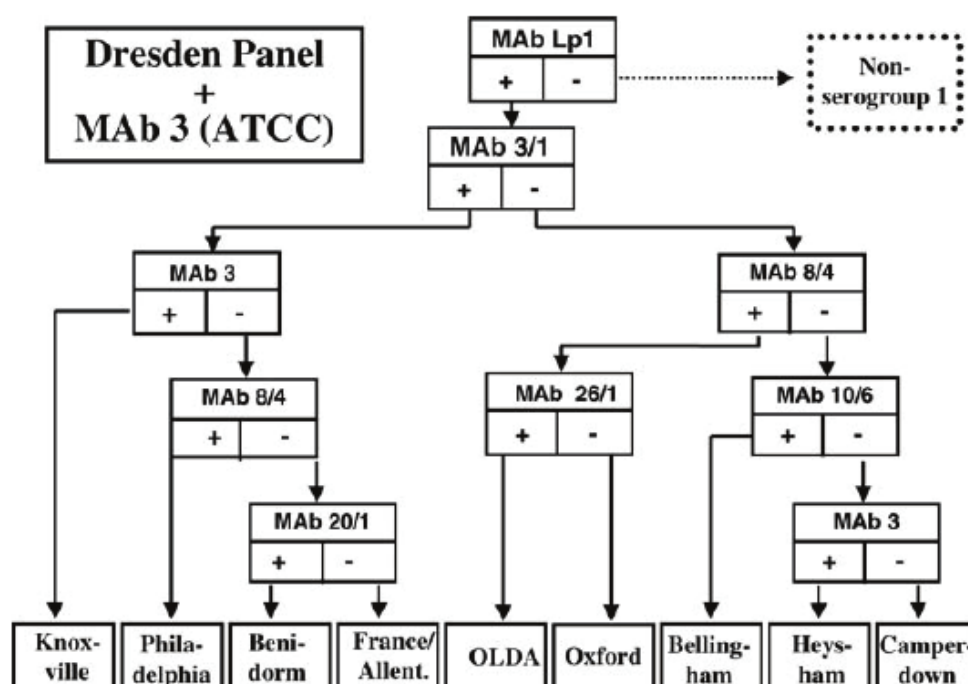
(+) avantage, (-) inconvénient, (?) critère non évalué



### III. Méthodes de typage moléculaire

Les méthodes de typage moléculaire sont utilisées non seulement pour les enquêtes épidémiologiques sur la légionellose afin de déterminer les sources d'infection, mais également pour déterminer la distribution des souches de *L. pneumophila* dans des zones spécifiques (Borchardt et al., 2008; Chasqueira et al., 2009; Harrison et al., 2009; Kozak-Muiznieks et al., 2014).

Le typage phénotypique est réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux (Mabs) selon le panel de Dresden dirigés contre le LPS (lipopolysaccharide) par une technique d'immunofluorescence. Ce panel comprend 4 anticorps auxquels on rajoute le Mab 3 de l'American Type Culture Collection (ATCC). Il permet en fonction de la positivité de l'agglutination avec l'anticorps de différencier 9 sous-groupes répartis en 2 catégories selon leur réactivité avec l'anticorps monoclonal 3/1 (Figure 22) (en fonction de l'expression d'épitopes sur le lipopolysaccharide (Helbig et al., 1997). Les Mab dirigés contre ces antigènes ont des souches de Lp1 différenciées en Mab 3/1 positif, associé à une virulence plus élevée et un Mab 3/1 négatif (Helbig et al., 2002). Ainsi les souches des sous-groupes Knoxville, Philadelphia, Benidorm et France/Allentown sont Mab 3/1+. Elles sont plus impliquées dans les cas cliniques, communautaires et liés au voyage (Figure 12). Les souches Mab 3/1- (sous-groupes Olda, Oxford, Bellingham, Heysham et Camperdown) sont, quant à elles plus fréquemment retrouvées dans l'environnement (Harrison et al., 2009).



**Figure 12.** Schéma d'interprétation du sous-groupage des *L. pneumophila* sg1 utilisant le panel d'anticorps monoclonaux de Dresden plus l'anticorps monoclonal 3 de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Helbig et al., 2002).

On peut rappeler qu'un autre panel avait été décrit initialement par Joly et al. (1986). Il apparaît que ce typage est une première étape de différenciation des souches de *L. pneumophila* sg1 identifiées en pathologie humaine mais a un pouvoir discriminant nettement inférieur aux techniques moléculaires décrites ci-après puisque seuls 9 sous-groupes sont identifiés par les anticorps monoclonaux. Son intérêt réside dans sa complémentarité avec les méthodes génotypiques.

Plusieurs autres méthodes de typage génotypiques ont été appliquées, telles que le polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés (AFLP), l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis ou PFGE), la Sequence-based typing (SBT) et la New Generation Sequencing (NGS).

Il a été démontré que le typage génomique AFLP avait un plus grand pouvoir discriminant et était efficace pour établir la corrélation clonale entre les souches cliniques et environnementales de la *L. pneumophila*. Cependant, plusieurs inconvénients ont été observés lors de l'utilisation de cette méthode, notamment la difficulté à déterminer la taille des fragments et la difficulté à comparer les modèles génomiques entre différents laboratoires et plates-formes (Fry et al., 2002).

La première méthode utilisée par la qualité de son pouvoir discriminant (supérieur à 98 %) est l'analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé. La SBT est, quant à elle, la méthode de référence européenne pour le typage. Celui-ci peut être réalisé sur souche après extraction de l'ADN (Gaia et al., 2005; Ratzow et al., 2007), ou directement sur le prélèvement respiratoire, on parlera dans ce cas de Nested-SBT (Ginevra et al., 2009; Luck et al., 2013).

La PFGE est l'un des standards de référence en matière d'enquête sur les épidémies et d'étude de la diversité génétique de *Legionella* ; cette méthode est utilisée depuis plusieurs années. La méthode est basée sur la séparation par électrophorèse en champ impulsif de fragments de macrorestriction du chromosome bactérien générés par digestion avec une endonucléase de restriction de site de coupe peu fréquente. Rapidement, cette technique consiste à digérer l'ADN chromosomique par l'enzyme de restriction. Le chromosome bactérien est ainsi coupé par l'enzyme à des sites de clivage donnant des grands fragments de 10 à 800 kb. L'électrophorèse en champ pulsé est alors utilisée pour les séparer et le profil obtenu est appelé pulsotype. Le meilleur pouvoir discriminant est obtenu avec l'enzyme *SfiI* (Luck et al., 2013; Zhou et al., 2010), mais l'enzyme *NotI* peut également être utilisée (Luck et al., 1991).

Les inconvénients majeurs de cette méthode sont que cette technique est longue et dépendante du laboratoire. En effet, d'une part, elle nécessite un repiquage de la souche et 4 jours consécutifs de technique. D'autre part l'interprétation basée sur la lecture de profils (obtenus après migration électrophorétique) n'est pas comparable d'un laboratoire à l'autre. Cependant cette méthodologie présente un grand avantage car elle présente un très fort pouvoir discriminant (supérieur à 98%, supérieur à la technique SBT décrite ci-dessous).

Le Sequence Based Typing (SBT), proposé par le groupe de Travail Européen sur les Infections à *Legionella* (EWGLI, devenu le groupe d'étude ESCMID pour les infections à *Legionella*, ESGLI), est une méthode de référence européenne, correspondant à une amplification et un séquençage de 7 gènes (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *mompS*, *proA* et *neuA*) (Ratzow et al., 2007; Fontana et al., 2014). Cependant la NGS est une technique basée sur le séquençage total du génome (Besser et al., 2018). Les résultats sont rapportés sous la forme d'une combinaison d'allèles (profils alléliques à sept chiffres) et de types de séquence numérotés en série (ST) (par exemple le profil allélique 1,4,3,1,1,1,1, correspond au ST1). L'assignation du profil allélique et du ST est obtenue en soumettant les données des séquences sur le site d'EWGLI. Bénéficiant des avantages de la robustesse des données et de la facilité de comparaison inter-laboratoires, le traitement par SBT est maintenant accepté dans le monde entier et largement utilisé pour le génotypage de *L. pneumophila*. Des études récentes ont révélé des corrélations significatives entre le type de séquence SBT (ST) et le génotype complet basé sur le génome (Sanchez-Buso et al., 2014; Underwood et al., 2013). Ainsi, le SBT représente un outil utile pour l'échange facile, rapide et efficace de données épidémiologiques moléculaires (Rota et al., 2011) et a été couramment utilisé comme méthode de typage moléculaire pour caractériser les souches de *L. pneumophila* dans des études récentes (Coscolla et al., 2010; Sanchez-Buso et al., 2015). Cette méthode présentant un pouvoir discriminant de 96 %, et atteint plus de 98% lorsqu'elle est combinée au sérotypage par Mabs (Gaia et al., 2005; Fontana et al., 2014).

Pour les prélèvements respiratoires pour lesquels une souche n'a pas été isolée, une PCR nichée de chacun des 7 gènes (Nested-PCR-based SBT) encore appelée nested-SBT, a également été développée et permet d'obtenir des profils alléliques complets et un ST directement à partir d'un prélèvement clinique (Ginevra et al., 2009).

#### IV. Méthodes de caractérisation physico-chimique de surface

La caractérisation des interphases d'entités biologiques (molles et hydratés) est un domaine récent qui a emprunté à la physico-chimie des outils développés pour des particules solides et dures. Quelques études ont déjà utilisé ces techniques sur différentes souches de *Shewanella* (Korenevsky et al., 2002), *Klebsiella pneumoniae* (Clements et al., 2008), *Streptococcus salivarius* (Bos et al., 1998), *Bacillus subtilis* (Okuda et al., 2003), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas* (Hamadi et al., 2014; Hamadi and Latrache, 2008; Hamadi et al., 2008).

Explorer ces propriétés au niveau macroscopique, microscopique, voire moléculaire, est difficile au vu de la complexité et de la nature dynamique des constituants de la paroi bactérienne. Diverses approches macroscopiques ont été développées et sont essentiellement fondées sur l'estimation de l'hydrophobie de surface par mesure d'angle de contact ou de MATS (Microbiol Adhesion To Solvents) et du potentiel zêta par mobilité électrophorétique (technique de micro-électrophorèse) (Grare et al., 2007; Duval and Gaboriaud, 2010).

Même si ces méthodes ont largement contribué à la compréhension des propriétés physicochimiques des interphases bactériennes, elles restent limitées et correspondent à des approches considérant les particules biologiques comme des sphères dures et homogènes. Cette limitation a été récemment levée à l'aide d'études théoriques récentes qui permettent de quantifier les propriétés électrodynamiques tout en considérant le caractère mou et hétérogène des interphases bactériennes (Duval and Gaboriaud, 2010).

## Chapitre III. *Legionella* dans les réseaux d'eaux chaudes

### I. Introduction

*Legionella*, comme déjà cité, colonise une large variété de milieux hydriques artificiels (den Boer et al., 2002), incluant les Réseaux d'Eaux Chaudes (REC), les Tours Aéroréfrigérantes (TAR), les fontaines, les douches et les systèmes de climatisation (Springston and Yocavitch, 2017). C'est principalement à partir de ces réservoirs que les aérosols de légionelles vont être produits et provoquer, parmi les personnes exposées, une fièvre de Pontiac voire une légionellose (Fields et al., 2002b).

*Legionella* est classiquement isolée dans les circuits d'eau chaude de différents bâtiments : dont les établissements de santé, hôtels, ou encore immeubles d'habitation (Yu et al., 2008; Kanatani et al., 2017; Lasheras et al., 2006).

### II. Paramètres associés à la croissance

#### II.1. La température

La température est le premier facteur qui affecte *Legionella* dans l'eau. Cette bactérie est souvent présente dans les eaux réchauffées, les TAR et les REC où la température est comprise entre 25 et 45°C, parfois plus. La thermotolérance de cette bactérie pourrait expliquer sa prédominance dans ces milieux (Leclerc, 2005).

En étudiant l'effet de la température sur la croissance et l'activité métabolique de *Legionella*, Ohno et al. (2003) ont observé que ces deux facteurs diminuaient significativement entre 45 et 50 °C. L'activité métabolique était conservée jusqu'à 51,6 °C. Des études ultérieures ont évalué l'influence de la température sur la multiplication de *L. pneumophila* dans le biofilm entre 30 et 47 °C. Les résultats ont montré que 100 % des cellules étaient capables de se multiplier entre 41 et 43 °C contre 59,1 % à une température comprise entre 43,1 et 44,1 °C (Konishi et al., 2006; Abdel-Nour et al., 2013).

Selon Leclerc (2005), aucune bactérie ne se multipliait au-delà de 44,1 °C. Steinert et al. (1998) ont étudié la re-croissance de *L. pneumophila* Sg1 en augmentant la température progressivement jusqu'à 70 °C dans un système de distribution d'eau chaude d'un hôpital. Ils ont constaté que malgré l'arrêt de croissance de *L. pneumophila* à 44,1 °C, elle peut survivre sans se multiplier jusqu'à une température de 60°C. D'un autre côté, Ohno et al. (2003) ont expliqué que le maintien de la fraction cultivée de *L. pneumophila* dépendait de la densité cellulaire : à 10<sup>8</sup> UFC/ml, la cultivabilité des bactéries était maintenue plus longtemps durant une période de 85 jours qu'à 10<sup>6</sup> UFC/ml.

Dans le cadre de la gestion du risque lié aux légionelles, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) a rapporté qu'en fonction des températures, les durées nécessaires pour abattre une unité logarithme de légionelles sont respectivement de l'ordre de 20 minutes à 55 °C, 6 minutes à 57.5 °C et 2 minutes à 60 °C.

## II.2. Le régime hydrodynamique

La fixation cellulaire et l'établissement du biofilm bactérien au sein d'un réseau d'eau dépendent en grande partie de son régime hydrodynamique. Ainsi, le gradient de vitesse, la turbulence et son instabilité, la contrainte de cisaillement et les zones de recirculation et stagnation sont les principales caractéristiques de l'écoulement qui vont favoriser ou non la colonisation des conduits.

Le biofilm serait moins épais et plus adhérent à la paroi dans les conduits avec un débit important. Le régime turbulent favoriserait l'adhésion des microorganismes aux surfaces. Le détachement du biofilm par les forces de cisaillements dans un régime turbulent serait compensé par une accumulation plus rapide du biofilm et une colonisation d'autres surfaces due au transfert de la biomasse. Par contre, dans les zones de stagnation, la disponibilité en nutriments et en oxygène est limitée. Elle conduirait à une concentration en *Legionella* plus faible (Levi, 2001), tandis que les concentrations les plus élevées sont observées en régime turbulent (Liu et al., 2006).

Des études ont évalué l'évolution de la biomasse du biofilm en fonction des régimes d'écoulements (turbulent, laminaire voire stagnant) et de l'application de différents traitements à base de chlore, de composé d'ammonium quaternaire et de phénol avec un temps de contact de 10 minutes. Elles ont observé un taux d'abattement plus important lorsque le régime était stagnant et ont confirmé que le biofilm en régime turbulent est le plus adhérent (Buckingham-Meyer et al., 2007). Le biofilm dépendait du régime d'eau et une grande vitesse de cisaillement diminuait la diversité bactérienne dans le biofilm.

## II.3. La nature des matériaux

Des matériaux de différentes natures sont employés dans la conception des réseaux : cuivre, acier inoxydable, acier galvanisé, PVC et leurs comportements diffèrent au regard de la prolifération bactérienne.

Historiquement le cuivre constitue l'un des matériaux le plus utilisé dans les canalisations. Sa facilité de mise en œuvre a permis son déploiement avant l'arrivée des polymères. Ce métal a cependant une mauvaise résistance aux traitements chimiques entraînant des problèmes de corrosion en lien généralement avec les traitements chlorés. L'acier galvanisé est aussi majoritairement utilisé dans les réseaux d'eaux chaudes (REC) (Trouilhé, 2010). Ce matériau est constitué d'acier avec une couche superficielle de zinc qui permet une meilleure résistance aux traitements chimiques. Ce produit a longtemps été retenu en alternative au cuivre ou aux polymères plus coûteux. Mais sa facilité d'entartrage constitue sa principale faiblesse en matière de lutte contre le développement de *Legionella*. Aujourd'hui, son usage est fortement déconseillé.

L'acier inoxydable est un alliage de fer et de carbone auquel on ajoute du chrome. Contrairement à ce qui est couramment admis, la surface de ce produit est très réactive et son oxydation partielle forme une véritable peau protectrice peu corrosive. Cependant, le coût de ce produit limite son usage (van der Kooij

et al., 2005). En plus de ces matériaux, des éléments à base de caoutchouc comme la silicone et le PVC se trouvent normalement dans les REC utilisés comme vannes, clapets, jonctions, ou modules de filtration. Ces dernières années, des travaux ont été réalisés pour évaluer l'impact de ces produits vis-à-vis de la croissance microbienne. van der Kooij et al. (2005) ont par exemple comparé expérimentalement la croissance de *Legionella* sur trois matériaux : le cuivre, l'acier inoxydable et le polyéthylène réticulé (PEX) à l'aide d'un montage expérimental simulant un REC. Après analyse de l'eau contenue dans les tubes en PEX, acier inoxydable et cuivre, la concentration de *Legionella* dans l'eau de la tuyauterie en cuivre s'est avérée dix fois moindre. Cependant, au bout de deux ans, les auteurs ont observé que l'impact bénéfique du cuivre s'estompait. En ce qui concerne la concentration de *Legionella* dans le biofilm, la plus faible valeur après deux ans d'observation a été observée pour le biofilm formé sur les matériaux en cuivre (les ions cuivre ont des effets inhibiteurs sur la croissance de *L. pneumophila*) et la plus forte pour les tuyaux en PEX.

La concentration de *L. pneumophila* était significativement plus élevée sur les matériaux en acier galvanisé. Des travaux ont montré que le nombre de *L. pneumophila* sur l'acier galvanisé dépasse celui trouvé normalement sur l'acier inoxydable et les matériaux en plastiques ; ce qui peut être probablement dû à la plus grande disponibilité du fer liée à la corrosion de l'acier galvanisé et la libération des composés organiques par les polymères. En effet, le fer est un élément essentiel à la croissance de cette bactérie et habituellement sa disponibilité est limitée dans les systèmes aquatiques (Rogers et al., 1994b; Tai et al., 2012b).

#### II.4. La qualité physico-chimique de l'eau

Le carbone organique assimilable (COA) ou le carbone organique dissous biodégradable (CODB) sont souvent mesurés séparément en tant qu'indicateurs de croissance bactérienne dans l'eau. Le COA est une fraction du carbone organique total (0,1-9 %) qui peut être utilisé par des espèces de bactéries spécifiques conduisant à l'augmentation de la biomasse.

Outre la matière organique, le pH, la minéralisation et la teneur en oxygène dissous sont importants pour le contrôle de la corrosion, l'agressivité de l'eau et par conséquent la croissance bactérienne :

- Le pH peut varier entre 6,5 et 9 du fait d'une évolution de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous. Une eau avec un faible taux de CO (un pH élevé) peut obturer les conduites par dépôt de tartre et inversement, une eau chargée de CO<sub>2</sub> (pH bas) peut attaquer les matériaux et engendrer une corrosion et dans les deux cas favoriser la colonisation bactérienne,
- La dureté de l'eau exprimée par les taux de calcium et magnésium joue un rôle important en favorisant la croissance et l'adhésion bactérienne ; quand la dureté est plus grande, l'adhésion est plus importante par rapport au comportement des bactéries dans l'eau à dureté nulle (Koubar et al., 2013).

- La teneur en O<sub>2</sub> dissous peut être interprétée comme un signe de croissance biologique. L'O<sub>2</sub> dissous diminue au cours de la prolifération bactérienne.

### III. Le traitement anti-*Legionella*

À ce jour, plusieurs procédés de désinfection ont été décrits pour l'élimination des *Legionella* des REC. Parmi eux, les traitements chimiques et thermiques sont les plus largement utilisés. Les traitements chimiques comptent plusieurs natures de produit et méthodologies d'usages. Ils agissent, par ionisation en créant par exemple des ions cuivre et argent, par oxydation (chlore, brome, iode, dioxyde de chlore, chloramines, ozone, peroxyde d'hydrogène...) (Kim et al., 2002). Cependant, le biocide le plus utilisé pour la désinfection des REC et les tours aéroréfrigérantes est le chlore sous ses différentes formes (Cooper and Hanlon, 2010a; Marchesi et al., 2016; Sanli-Yurudu et al., 2007).

Même si des traitements variés sont disponibles, la littérature décrit de nombreux échecs de désinfection qui se caractérisent en général par des recontaminations plus ou moins tardives de l'eau du réseau (Thomas et al., 2004). Deux causes principales sont évoquées pour expliquer ces échecs :

*L. pneumophila* est une bactérie à développement intracellulaire qui a la capacité de se multiplier à l'intérieur d'amibes. À l'intérieur de ces cellules, les bactéries sont protégées de certains stress, dont certains biocides vis-à-vis desquels les amibes sont résistantes. Les bactéries libérées ont, en outre, une résistance supérieure aux bactéries cultivées sur géloses : elles sont moins sensibles aux variations de températures, de pH, d'osmolarité et à l'exposition aux biocides (Kwaik et al., 1998). Les amibes ont pour particularité de s'enkyster lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Or, *L. pneumophila* peut persister à l'intérieur des formes enkystées, ce qui lui permet de résister à des concentrations en chlore atteignant 50 ppm (Kim et al., 2002).

La deuxième cause évoquée pour expliquer la résistance de *L. pneumophila* aux traitements est la colonisation des biofilms qui se mettent en place dans les réseaux de canalisations d'eau. Peu d'études concernant le rôle de biofilms ne contenant pas d'amibes dans la protection de la bactérie ont été réalisées. Il a tout de même été démontré que des bactéries sessiles sont plus de 100 fois plus résistantes à l'iode que des bactéries planctoniques (Kim et al., 2002). De la même manière, les biofilms mono-espèces de *L. pneumophila* formés dans un milieu de culture riche en contact avec l'acier inoxydable avaient pu continuer à croître malgré un choc chloré de 50 ppm pendant 1 h. Le biofilm semble donc jouer un rôle important dans la persistance de *L. pneumophila* dans un réseau (Cooper and Hanlon, 2010a).



## Chapitre IV. Adhésion bactérienne et formation de biofilm

### I. Introduction

Les bactéries existent généralement dans l'un des deux types de population : planctonique ; libre dans une suspension, et sessile ; en tant qu'élément attaché à une surface. D'une manière générale, environ 95% de la population mondiale de bactéries se retrouve sous la forme d'un biofilm à différents stades de croissance et les biofilms sont aussi divers que les bactéries sont nombreuses (Dalton and March, 1998).

Des biofilms ont été observés dès 1674, lorsque Antonie van Leuwenhoek a utilisé son microscope primitif mais efficace pour observer des microorganismes sur des surfaces dentaires humaines (Costerton, 1999). Depuis lors, de nombreux progrès dans la technologie et les pratiques de travail en laboratoire ont permis de créer des descriptions plus précises des biofilms. Heukelekian and Heller (1940) ont observé que la croissance et l'activité bactérienne augmentent avec l'incorporation de la surface où ces bactéries peuvent adhérer. Zobell (1943) a observé que le nombre de bactéries sur la surface est plus élevé que dans un milieu de suspension. Cependant, la vraie observation de biofilm a été connue par l'apparition du microscope électronique. Jones et al. (1969) ont utilisé le microscope électronique à balayage et le microscope électronique à transmission pour examiner le biofilm et ils ont montré que ce biofilm est composé de différents microorganismes.

Les biofilms bactériens sont des communautés bactériennes sous forme d'amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice d'exo-polysaccharides et attachés à une surface (Tremblay et al., 2014). Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique qu'abiotique. Le biofilm peut adopter des architectures variées (monocouche, microcanaux, microcolonies...) qui résultent du type d'espèces microbiennes le colonisant et des conditions de culture (milieu environnant, surface, flux...) (Garrett et al., 2008).

La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm (Richards and Melander, 2009). Il semblerait que ce mode d'existence particulier soit le mode de croissance prédominant pour la plupart des espèces microbiennes (Palmer et al., 2007). Ce fait peut être expliqué par les nombreux avantages de ce mode de vie :

- Disponibilité en nutriments à proximité des surfaces : il a été démontré que les surfaces accumulaient de nombreuses molécules organiques et composés minéraux qui servent de substrats nutritionnels au développement microbien. Les surfaces elles-mêmes peuvent représenter une source de nutriments pour les micro-organismes ;
- Proximité de différentes cellules de la même espèce ou d'espèces différentes qui augmente la probabilité des transferts génétiques horizontaux et la coopération cellulaire ;
- Protection vis-à-vis de conditions environnementales défavorables : l'homéostasie créée par les cellules permet aux bactéries de résister à de nombreux stress comme l'exposition aux UV, la

température, la dessiccation, des concentrations élevées en métaux lourds et biocides. Il semblerait que la matrice extracellulaire joue un rôle protecteur important (Garrett et al., 2008).

- Modifications d'expressions géniques et donc phénotypiques : ces modifications concernent notamment le taux de croissance et la structure pariétale (modification d'expression des porines chez les bactéries à Gram négatif...) (Hall-Stoodley et al., 2004).
- Protection contre les antibiotiques (Goldberg, 2002), les désinfectants (Cooper and Hanlon, 2010a) et les environnements dynamiques (Garrett et al., 2008).

Au cours des dernières décennies, la croissance du biofilm a été observée dans de nombreux domaines industriels et domestiques. Malheureusement, dans la plupart des cas, la croissance des biofilms a été préjudiciable. Beaucoup d'industries répondent aux effets négatifs de la croissance du biofilm d'un type ou d'un autre, ce qui peut entraîner de lourds coûts de nettoyage et de maintenance. Parmi les exemples de ces industries figurent ; les systèmes d'eau (Batté et al., 2003), les produits laitiers (Hamadi et al., 2014), les aliments (Menon, 2016), le pétrole (Nemati et al., 2001), le papier (Klahre and Flemming, 2000), les opticiens (Liesegang, 1997), la dentisterie (Marotta et al., 2002), les hôtels et les hôpitaux (Muchesa et al., 2017). Peut-être que l'environnement où les personnes sont exposées aux biofilms le plus souvent est l'environnement domestique (Barker and Bloomfield, 2000; Garrett et al., 2008). Par ailleurs, la détérioration du produit, la réduction de l'efficacité de la production, la corrosion, les mauvaises odeurs, l'infection, les contaminations, les blocages de tuyaux sont des exemples d'effets négatifs des biofilms. Pour ces raisons et l'émergence d'une législation restrictive concernant les effets des agents de nettoyage sur l'environnement, la santé et la sécurité des utilisateurs, il existe un intérêt industriel important pour le développement de matériaux et de méthodes pouvant éliminer et empêcher activement la formation de biofilms.

Les biofilms bactériens isolés de divers environnements partagent des caractéristiques communes (Garrett et al., 2008):

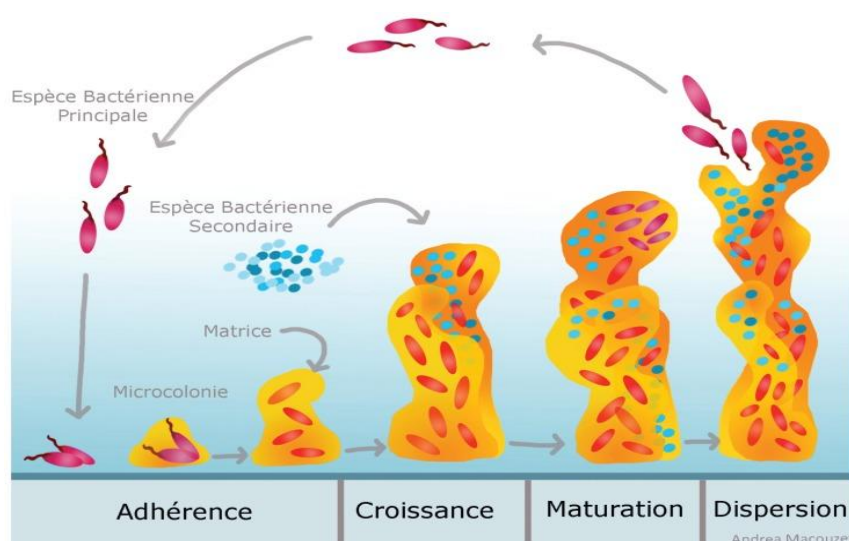
- ✓ Les cellules bactériennes sont retenues ensemble par une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques ;
- ✓ Le développement du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires, soit présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes ;
- ✓ Le biofilm protège les bactéries contre le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation et les biocides (antibiotiques et désinfectants).

L'importance des biofilms dans les réseaux d'eau est aujourd'hui communément admise. La littérature tend à montrer que la croissance de bactéries dans la phase planctonique d'un réseau de distribution est négligeable, que cette eau contienne ou non un désinfectant résiduel (Flemming et al., 2002). En réalité, la majeure partie des micro-organismes en suspension provient de la libération de cellules du biofilm. Dans un réseau, le biofilm est à l'origine de nombreux problèmes d'ordre sanitaire :

- Constitution d'une chaîne trophique à partir des micro-organismes adhérents aux surfaces pouvant aboutir au développement d'organismes indésirables, comme de petits invertébrés ;
- Dégradation des paramètres organoleptiques (turbidité, odeur, coloration) ;
- Dégradation des surfaces d'adhésion par phénomène de bio-corrosion ;
- Libération continue de micro-organismes et notamment de bactéries indicatrices de contamination (entérocoques, coliformes, *Clostridia*), pathogènes opportunistes ou non (*L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, coliformes, *Campylobacter sp...*) entraînant le non-respect des critères de potabilité (Borella P et al., 2005).

## II. Mécanismes d'adhésion et de développement bactérien

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes (Figure 13) :



**Figure 13.** Etapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien (Tremblay et al., 2014).

Les cellules se déposent sur la surface (1) et y'adhèrent (2). Les cellules s'enchâssent dans une matrice d'exopolymère (3) puis le biofilm mature (4). Le biofilm mature libère des cellules qui vont coloniser de nouvelles surfaces (5).

### II.1. Etape d'adhésion

L'adhésion est une accumulation de micro-organismes et de matériel extracellulaire sur une surface solide. C'est un processus qui s'effectue en plusieurs étapes :

- Transport vers la surface ;
- Adhésion non spécifique ou réversible ;
- Adhésion spécifique ou irréversible.

L'adhésion est un phénomène purement physico-chimique qui est suivi de phénomènes biologiques. C'est un processus au cours duquel on constate :

- Des modifications génétiques, phénotypiques et métaboliques ;

- Toutes les souches bactériennes n'ont pas la même capacité d'adhésion aux surfaces et des différences intra-espèces existent ;
- Des variations d'adhésion selon la nature et l'état de surface ;
- Des variations de la rugosité et des altérations des surfaces (corrosion, usure) modifient la formation des biofilms ;
- Des variations d'adhésion selon les conditions physico-chimiques et biologiques ;
- La concentration locale en cations divalents ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ...) facilite plus ou moins l'adhésion ;

### **II.1.1. Mise en place du film conditionnant**

Tout matériau immergé dans un milieu aqueux devient quasi-immédiatement recouvert de polymères provenant de ce milieu (Donlan, 2002). Les molécules polymériques, organiques ou inorganiques sont attirées vers les surfaces desquelles elles s'approchent, formant le film conditionnant. Ce film se dépose en l'espace de quelques minutes et peut se développer tant sur des surfaces biologiques (dents) qu'artificielles (cathéters, réseaux d'eau). Il peut être constitué de glycoprotéines, phosphoprotéines, albumines, lipides...

Le film conditionnant est le fondement sur lequel se développe un biofilm, il est requis pour l'adhésion des bactéries sur une surface (Palmer et al., 2007). Même si son rôle est parfois discuté (les protéines déposées sur une surface pourraient diminuer le nombre de sites d'attachement disponibles pour les bactéries), la majorité des auteurs pensent qu'il représente une source de nutriments non négligeable pour les microorganismes qui auraient donc tendance à se rapprocher des surfaces par chimiotactisme pour exploiter cette ressource. D'autre part, ces molécules adsorbées peuvent modifier les propriétés physico-chimiques de la surface (charge électrique, hydrophobicité...), favorisant ou défavorisant l'adhésion bactérienne (Hamadi et al., 2014).

### **II.1.2. Transfert des bactéries vers le support**

Le transfert des bactéries vers le support fait intervenir des phénomènes de nature physicochimique et biologique.

Les facteurs physiques sont représentés par :

- Les mouvements browniens ou transport diffusif ;
- La sédimentation, qui se produit par différence de gravité entre la bactérie et le fluide dans lequel elle se trouve ;
- Le transport convectif, dû à l'écoulement. Le transport convectif semble être particulièrement important pour l'attachement des bactéries. Un régime d'écoulement turbulent favoriserait l'adhésion en augmentant la probabilité de la rencontre entre la bactérie et une surface.

La chimiotaxie est le facteur biologique prédominant dans la phase de transfert des bactéries vers leur support. Ce système permet à la bactérie de reconnaître dans son environnement des substances chimiques attractives (nutriments par exemple) ou répulsives et d'orienter son déplacement sur de courtes distances. Dans un premier temps, les substances attractives ou répulsives se lient à des chimiorécepteurs à la surface des bactéries. Un système à 2 composants (une histidine-kinase, CheA, et un régulateur, CheY), universel à toutes les bactéries, permet ensuite la transduction du signal notamment vers le moteur flagellaire. L'activité flagellaire est ainsi modifiée (changement du sens de rotation du flagelle par exemple) de manière à orienter le déplacement bactérien vers les zones favorables (Pratt and Kolter, 1998). Ce phénomène a été confirmé par l'étude de (O'toole and Kolter, 1998).

### II.1.3. Adhésion réversible (adhésion non spécifique)

L'étape d'adhésion réversible résulte de l'interaction entre les bactéries et un substrat solide pour des distances globalement inférieures à 50 nm. Durant cette étape préliminaire de la formation du biofilm, les bactéries subissent toujours des mouvements browniens et sont facilement détachables, par exemple par des forces de cisaillement induites par la circulation d'un fluide. C'est d'ailleurs ce dernier paramètre qui permet de différencier la phase d'adhésion réversible de la phase d'adhésion irréversible. En phase d'adhésion irréversible, les forces nécessaires au détachement des cellules sont plus importantes (grattage, nettoyages chimiques, ultrasons) (Palmer et al., 2007).

Plusieurs approches physico-chimiques ont été utilisées pour décrire la phase d'adhésion réversible des bactéries à une surface, ou de bactéries entre elles.

- La théorie DLVO classique (de Derjaguin, Landau, Verwey, et Overbeek) est une théorie issue de la physique, concernant la stabilité des colloïdes, qui a été transposée pour expliquer l'adhésion de bactéries aux surfaces. Cette théorie décrit l'équilibre entre les forces de Lifshitz-van der Waals (attractives) et les forces électrostatiques (attractives ou répulsives) d'un système. Dans le cas d'un système d'interaction micro-organisme/substrat ou solide/liquide, ces forces sont représentées par les potentiels de surface zêta ( $\zeta$ ) des bactéries ou des substrats auxquels elles adhèrent. Elle peut être représentée par l'équation :

$$G^T = G^{LW} + G^{EL}$$

$G^T$  : l'énergie totale d'interaction ;

$G^{LW}$  : L'énergie d'interaction des forces de Lifshitz-van der Waals

$G^{EL}$  : L'énergie d'interaction des forces électrostatiques (Bos et al., 1999).

Les interactions électrostatiques peuvent varier en fonction de la force ionique d'un milieu. Ainsi, la présence de cations (surfaces cellulaires, supports) favorise l'étape d'adhésion entre surfaces chargées négativement (Hermansson, 1999). La répulsion électrostatique est fortement influencée par la

concentration ionique de la solution : plus la concentration ionique est importante, plus on diminue la force de répulsion électrostatique et plus on réduit la distance entre les cellules et la surface.

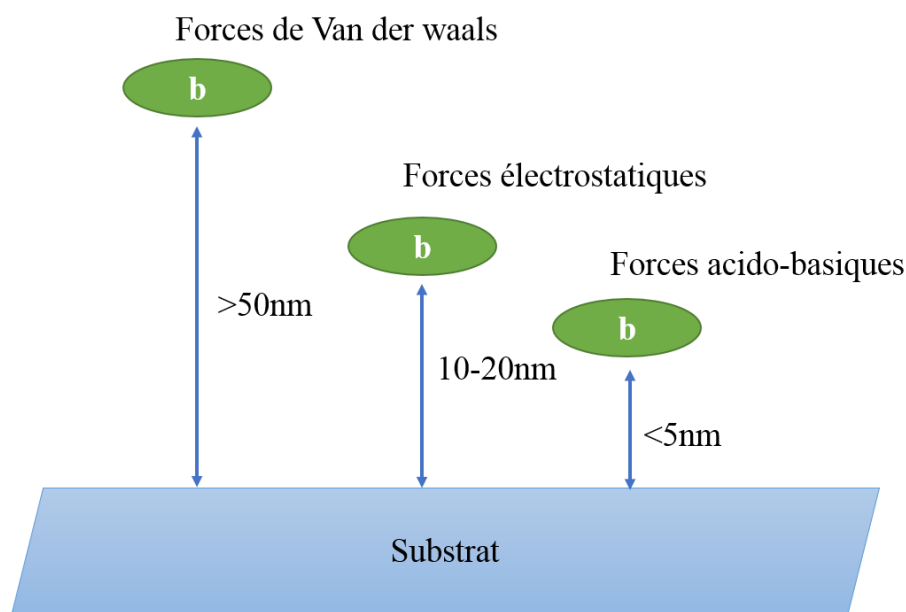
- Dans l'approche thermodynamique, les énergies libres de surface de tous les éléments du système (bactéries/substrat, solide/liquide) (Figure 14) interviennent selon l'équation suivante :

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sm} - \gamma_{sl} - \gamma_{ml}$$

$\gamma_{sm}$  = l'énergie libre substrat-micro-organisme ;

$\gamma_{sl}$  = l'énergie libre substrat-liquide ;

$\gamma_{ml}$  = l'énergie libre micro-organisme-liquide.



**Figure 14.** Adhésion initiale des bactéries: système d'interaction entre surface inerte et la bactérie (Bos et al., 1999).

Les énergies libres se calculent selon les angles de contact (donc l'hydrophobicité des surfaces). Comme tous ensemble, le système des surfaces en interaction évolue dans le but d'atteindre une énergie libre minimale. Ainsi, selon cette théorie, l'adhésion microbienne est favorisée lorsque  $\Delta G_{adh} < 0$ . Toutefois, cette approche néglige les forces d'interactions électrostatiques (Bos et al., 1999).

Plus récemment, la théorie DLVO étendue a été développée (Van Oss et al., 1986). Plus complète que les 2 premières théories, elle prend en compte les interactions de Lifshitz-Van der Waals, des interactions électrostatiques, des interactions acides-bases de Lewis et du mouvement brownien. Cette théorie peut être considérée comme une combinaison des théories thermodynamique et DLVO classique. D'autres interactions, comme les interactions stériques, peuvent également être prises en compte pour modéliser l'adhésion des cellules à une surface.

#### **II.1.4. Adhésion irréversible (adhésion spécifique)**

Malgré l'intérêt évident de ces théories (théories thermodynamique et DLVO classique) pour la compréhension des mécanismes d'adhésion, il est nécessaire de rappeler que ces approches sont des modèles physico-chimiques, adaptés à l'étude de l'adsorption de particules colloïdales inertes et bien définies (formes, charges, etc.). L'adhésion de cellules bactériennes, du domaine du vivant, fait également intervenir les appendices physiques et des paramètres biologiques des bactéries (flagella, polysaccharides, fimbriae et pili) qui ne sont pas pris en compte par ces théories (Hermansson, 1999). Chez *E. coli* par exemple, l'adhésion bactérienne est dépendante de la présence de pili particuliers, nommés curli (Saldaña et al., 2009).

### **II.2. Prolifération et architecture du biofilm**

#### **II.2.1. Croissance et maturation du biofilm**

Il s'agit de la deuxième étape de la formation du biofilm, au cours de laquelle les bactéries vont s'agglutiner, se multiplier et former des micro-colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface selon les propriétés de surface des bactéries et des matériaux. La structure du biofilm dépend des conditions environnementales telles que la source de carbone ou le régime hydrodynamique (Stanley et al 2003 ; Klausen et al 2006). Par la suite, le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (Costerton et al 1995 ; Davey et O'Toole 2000). Dans cette structure tridimensionnelle se forment des canaux permettant la circulation des nutriments et de l'oxygène (Costerton, 1999) et, l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien. Finalement, l'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque les phénomènes d'arrachement du biofilm compensent sa croissance. En outre, les bactéries modifient fondamentalement leur comportement, via, notamment un second messager, c-di-GMP (di-GMP cyclique), qui a la capacité d'activer ou de réprimer l'expression de gènes lorsque la bactérie se trouve à proximité d'une surface (augmentation de la production de polysaccharides, diminution de la synthèse du flagelle, etc.).

La différence dans l'expression des gènes entre les deux états bactériens (planctonique / sessile) est associée aux besoins adhésifs de la population. Par exemple, la production d'appendices de surface est inhibée dans les espèces sessiles car la motilité est restreinte et n'est plus nécessaire. Simultanément, l'expression d'un certain nombre de gènes pour la production de protéines de surface cellulaire et de produits d'excrétion augmente. Les protéines de surface (porins) telles que Opr C et Opr E, permettent le transport de produits extracellulaires dans la cellule (Hancock et al., 1990) et les matériaux d'excrétion hors de la cellule, par exemple les polysaccharides.

### II.2.2. Dispersion du biofilm

L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes (Dunne, 2002). Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm, se transmettre vers de nouveaux réservoirs (homme). Le détachement des cellules peut être initié par différents facteurs : des perturbations mécaniques (force de cisaillement, abrasion), limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (Sauer et al 2002), la dégradation enzymatique de la matrice polymérique (dispersine B), la dégradation enzymatique du substrat sur lequel le biofilm est attaché (hyaluronidase), l'induction de la motilité, la production d'agents tensioactifs (rhamnolipides) et le relâchement de l'exopolysaccharide.

Cette dispersion et dissolution du biofilm sont intimement liées à l'impact biochimique des molécules régissant la croissance du biofilm (quorum sensing) ou le limitant (quorum quenching) par interactions sur la régulation génétique et phénotypique des bactéries.

La quorum sensing décrit un processus dans lequel un certain nombre d'inducteurs automatiques (signaux chimiques et peptidiques) sont utilisés pour stimuler l'expression génétique au sein d'une population bactérienne et en fonction de la densité de cette population. (A l'atteinte d'un seuil de concentration moléculaire, certaines molécules induisent la formation des biofilms) (Goldberg, 2002). Si le « Quorum Sensing » est une communication intercellulaire via un gradient moléculaire signal, il existe à l'inverse un processus de régulation, le « Quorum Quenching » qui correspond à toutes les molécules ou mécanismes d'interactions capables de limiter la formation d'un biofilm en modifiant la communication intercellulaire et les gradients intermoléculaires entre bactéries (Hoang and Schweizer, 1999).



---

***PARTIE II :***

***TRAVAIL EXPERIMENTAL***

---

## **Chapitre I : Enquête épidémiologique nationale et détermination de la prévalence de *L. pneumophila* dans les établissements hôteliers du Maroc**

### **I. Introduction**

La légionellose, principalement causée par *L. pneumophila*, mais aussi par d'autres espèces de *Legionella*, est une forme importante de pneumonie. L'infection est transmise par inhalation d'aérosols générés par des systèmes d'eau tels que les systèmes d'eau chaude, les tours de refroidissement, douches, spas et robinets (Steinert et al., 2002; Craun et al., 2010).

Les espèces de *Legionella* sont fréquemment détectées dans les systèmes de distribution d'eau des établissements résidentiels, tels que les hôtels, les hôpitaux et les centres de santé (Barna et al., 2016). Ces bactéries pourraient adhérer à diverses surfaces, survivre dans les biofilms et au sein des amibes libres. Les biofilms constituent une niche protectrice contre les procédures de traitement de l'eau et les conditions stressantes de l'environnement (Abdel-Nour et al., 2013). La stagnation de la température de l'eau chaude et de l'eau entre 20 et 45 °C fournit un idéal habitat pour la croissance massive de cette bactérie (Van der Kooij et al., 2017; Barna et al., 2016).

Des études récentes ont montré des taux d'isolement variables de *Legionella* avec 8,3% en Corée du Sud (Hwang et al., 2016), 19,5% au Maroc (Tai et al., 2012a), 31,5% en Iran (Rafiee et al., 2014), 32,7% en Allemagne (Kruse et al., 2016) et 43,6% au Koweït (Al-Matawah et al., 2012). Plusieurs autres études dans les pays européens ont identifié une forte prévalence des espèces de *Legionella* dans les systèmes d'eau chaude des hôtels, des hôpitaux et des appartements domestiques (Zacheus and Martikainen, 1994; Zietz et al., 2001; Borella et al., 2005b; Leoni et al., 2005; Mouchtouri et al., 2007b). Bien que ces rapports suggèrent l'importance de la surveillance et du contrôle de la colonisation par *Legionella* dans les systèmes d'eau chaude, on en sait peu sur la contamination des systèmes d'eau chaude dans les établissements résidentiels au Maroc, notamment les hôtels. Au cours des dernières années, et depuis le renforcement de la surveillance de *Legionella* au niveau mondiale et l'adhésion du Maroc à l'ECDC, des cas de légionellose notifiés à l'ECDC ont été reliés à la fréquentation d'établissements touristiques marocains (Bulletin INH, 2017).

En raison des conséquences graves qu'elle peut avoir, la nécessité de développer des études et recherches pour une amélioration des connaissances sur les dangers et les risques sanitaires liés aux légionelles à des fins de surveillance et de protection est recommandée, dont le but d'aboutir à des recommandations pour la protection de la population exposée, par la mise en œuvre de solutions préventives et correctives à savoir l'amélioration des techniques d'installation des réseaux d'eau chaude sanitaire, l'application des moyens de désinfection adaptés et l'établissement d'un plan de surveillance des *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude sanitaire.

Il a été alors apparu nécessaire de fournir aux partenaires impliqués dans la surveillance et le contrôle de la maladie, les informations actualisées sur l'épidémiologie de la légionellose, les sources de

contamination et le risque lié aux légionelles dans les eaux chaudes sanitaire des établissements hôteliers du Maroc.

Dans la présente étude, nous avons réalisé une enquête épidémiologique nationale au niveau des établissements hôteliers situés dans les principales villes touristiques du Maroc. Il s'agit de rassembler et collecter l'ensemble des informations et des données relatives à la situation de la présence de *Legionella* au Maroc et les installations qui auraient pu être à l'origine des infections.

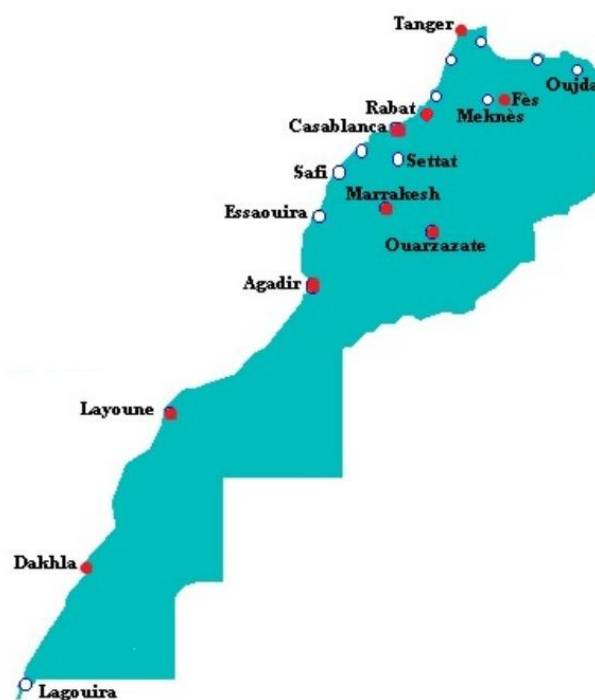
L'objectif est double :

- Le travail sur le terrain s'est intéressé à la collecte des informations propres à l'étude par le biais des enquêtes d'investigation, des questionnaires et à l'inspection visuelle des locaux de production de l'eau chaude. Ensuite, la réalisation des prélèvements au sein des sites de prolifération possible des Légionelles comme les eaux chaudes sanitaires des chambres, Jacuzzis, spas, robinets, fontaines décoratives...etc.
- Au niveau du laboratoire, notre travail s'est focalisé sur l'analyse des échantillons (Isolement, recherche et dénombrement), l'étude de la prévalence de *L. pneumophila* dans les établissements hôteliers et la détermination des facteurs de risque associés à la contamination, soupçonnés d'être liés à la présence et à la croissance de *Legionella*.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Questionnaire : Investigation des sites à risque

L'investigation épidémiologique a nécessité une enquête nationale qui repose sur l'évaluation du niveau de contamination des réseaux de distribution des eaux chaudes sanitaires. Pour réaliser l'enquête sanitaire, une cartographie d'étude a été établie, c'est ainsi que les structures ciblées par cette étude sont des établissements hôteliers appartenant aux villes touristiques suivantes : Agadir, Casablanca, Dakhla, Fès, Layoune, Marrakech, Ouarzazate, Rabat et Tanger (Figure 15). Sur le terrain, des informations propres à l'étude ont été collecté par le biais d'un questionnaire (Annexe I) et par la suite des prélèvements ont été réalisés au sein des sites de prolifération possible des légionelles comme : Eaux chaudes sanitaires des chambres, Jacuzzis, fontaines décoratives, robinets, les pommes de douches, etc.



**Figure 15.** Carte des principales villes touristiques sujet de l'enquête (Points en rouge)

L'échantillonnage de l'eau faisait partie de l'enquête sanitaire sur place, y compris l'inspection visuelle des salles et des locaux techniques de production d'eau chaude sanitaire (chaufferies), du réseau de plomberie et des conditions d'hygiène. Différents paragraphes du questionnaire ont été développés en collectant le maximum de données sur l'établissements hôteliers à savoir : âge, taille, source d'eau potable, production d'eau chaude sanitaire (systèmes de chauffage, réservoirs et volume, adoucissement) et caractéristiques de la plomberie (matériaux de plomberie, âge des systèmes, désinfection, température de l'eau).

Au cours de notre visite des établissements hôteliers, un ensemble des actions ont été réalisés in situ des installations à risque pour collecter le maximum des données qui vont servir comme base pour mieux interpréter les résultats de l'enquête et aboutir à des recommandations pour la protection de la population exposée, par la mise en œuvre de solutions correctives et préventives :

❖ La vérification des supports documentaires suffisants (Carnet sanitaire) :

- Plans et schémas, pour vérifier la bonne connaissance des réseaux et leur cohérence hydraulique;
- Résultats d'analyses et de suivis, en particulier ceux des légionelles et des températures, pour savoir si des dysfonctionnements ont déjà eu lieu et si la stratégie d'échantillonnage est judicieuse.
- Contrats/gammes de maintenance et éléments de traçabilité associés, pour vérifier ce qui est censé être fait et ce qui est fait (par exemple en matière de désinfections...) ;

- Protocoles de gestion des situations de contamination, pour évaluer l'organisation de l'établissement ;
  - Diagnostic des réseaux, rapport d'inspection et plan d'actions, pour savoir s'ils existent et s'ils sont pris en compte.
- ❖ L'évaluation de l'état général des éventuels dispositifs de traitement d'eau, de production d'eau chaude sanitaire (ECS) et de distribution d'eau sanitaire en recherchant des signes de dégradation / absence d'entretien :
- Bras morts ou attentes inutilisées ;
  - Adoucisseurs ;
  - Présence de dépôts (sur les mousseurs, dans les filtres, dans l'eau de vidange des réservoirs, dans le bac à sel de l'adoucisseur...) ;
  - Présence de tartre ou de corrosion, notamment à l'intérieur des manchettes témoin (si existantes);
  - Présence de fuites ;
  - Calorifuge intégral, partiel ou absent ;
- ❖ L'évaluation des températures et les moyens de surveillance de ce paramètre :
- Mesurer la température de l'eau en divers points (sortie de production ECS, retour de boucle, points d'usages éloignés de la production). Vérifier la cohérence avec les thermomètres installés et les résultats enregistrés.
  - La température de l'ECS doit être supérieure à 55°C au départ et aussi supérieure à 50°C sur le réseau de distribution en tout point et notamment sur le retour de boucle.

## II.2. Echantillonnage

Au total, 149 échantillons d'eau ont été prélevés à partir de 118 hôtels des principales villes touristiques du Maroc entre janvier 2015 et Avril 2018. Le plan d'échantillonnage des bâtiments a été conçu pour représenter l'ensemble du système de plomberie (prélèvement dans les réservoirs de stockage d'eau chaude, les boucles de retour et les sorties distales, y compris les pommes de douches et les robinets). Les échantillons provenant des pommes de douche et des robinets ont été prélevés dans les chambres les plus éloignées du point de départ de l'eau chaude. Les chambres ont été sélectionnées pour assurer une distribution uniforme parmi tous les systèmes de distribution d'eau chaude et le nombre d'échantillons collectés a été déterminé par la taille de chaque hôtel. Les échantillons ont été recueillis après que l'eau ait été drainée pendant 15 à 30 secondes dans une bouteille en plastique stérile de 1 litre contenant 1ml de thiosulfate de sodium 0,1N pour neutraliser le chlore libre résiduel. Tous les échantillons ont été recueillis suivant des méthodes standard mises en vigueur tout en respectant les conditions de prélèvement et de transport au laboratoire.

Les prélèvements au niveau de points d'usage d'ECS ont été parfois réalisés au premier ou au second jet. Dans le premier cas, les résultats reflèteront la contamination locale et dans le second cas, ils reflèteront la contamination des stations thermales ou du réseau de distribution depuis l'amont. La température de l'eau a été mesurée au moment du prélèvement par un thermomètre infrarouge (Helect, France).

### **II.3. Recherche, dénombrement et identification de *Legionella***

Les bouteilles de collecte ont été retournées au laboratoire immédiatement après l'échantillonnage pour un examen bactériologique ; si les analyses ne débutaient pas dans les 24 heures, les échantillons sont conservés à 4°C et analysés dans les 48 heures suivant le prélèvement. Les échantillons ont été analysés au laboratoire de la Microbiologie des Eaux et Hygiène de l'Environnement à l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca par la méthode de culture et d'identification microbiologiques selon la norme T90-431 (avril 2014) « Détection et dénombrement de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* - Méthode par inoculation directe et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation ».

Les analyses au laboratoire ont été gratuites, et à la fin de l'étude, chaque établissement participant à l'étude avait reçu une lettre avec les résultats de recherche et dénombrement de *Legionella*.

Au niveau de notre laboratoire, la recherche et le dénombrement de *L. pneumophila* est réalisée comme suit :

#### **II.3.1. Concentration par filtration :**

Pour détecter *Legionella*, nous avons concentré des échantillons d'eau de 1L par filtration sur filtre d'acétate de cellulose de porosité 0.45µm de taille de pores (Sartorius, France). Par la suite, le filtre a été mis dans 5ml d'eau distillée stérile.

#### **II.3.2. Ultrasonication :**

Les microorganismes retenus sur le filtre sont détachés par la sonication dans la suspension de 5mL d'eau distillée stérile pendant 2 minutes à 60 kHz.

#### **II.3.3. Traitement thermique et acide :**

Après avoir préparé le concentrat, une partie de ce dernier fait l'objet de deux traitements afin de réduire la flore annexe.

##### **II.3.3.1. Traitement thermique :**

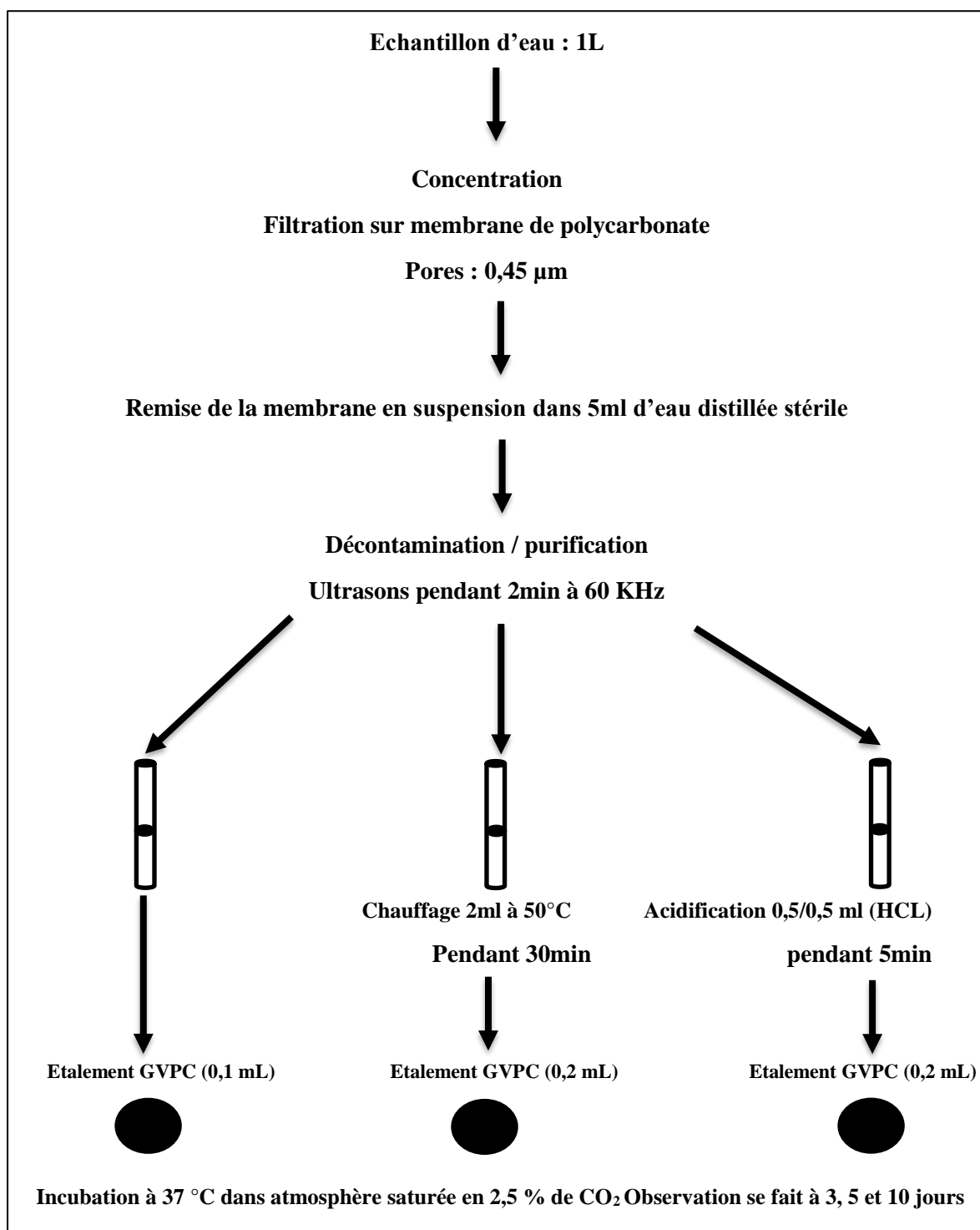
2mL de cette suspension ont été mis dans un tube à essai et traités thermiquement à 50°C pendant 30min dans un bain-marie.

##### **II.3.3.2. Traitement Acide :**

1 mL de la suspension du concentrat est mélangé dans un tube à essai avec 1 mL de tampon acide HCl-KCl de pH 2,2, puis laissé en contact pendant 5 minutes.

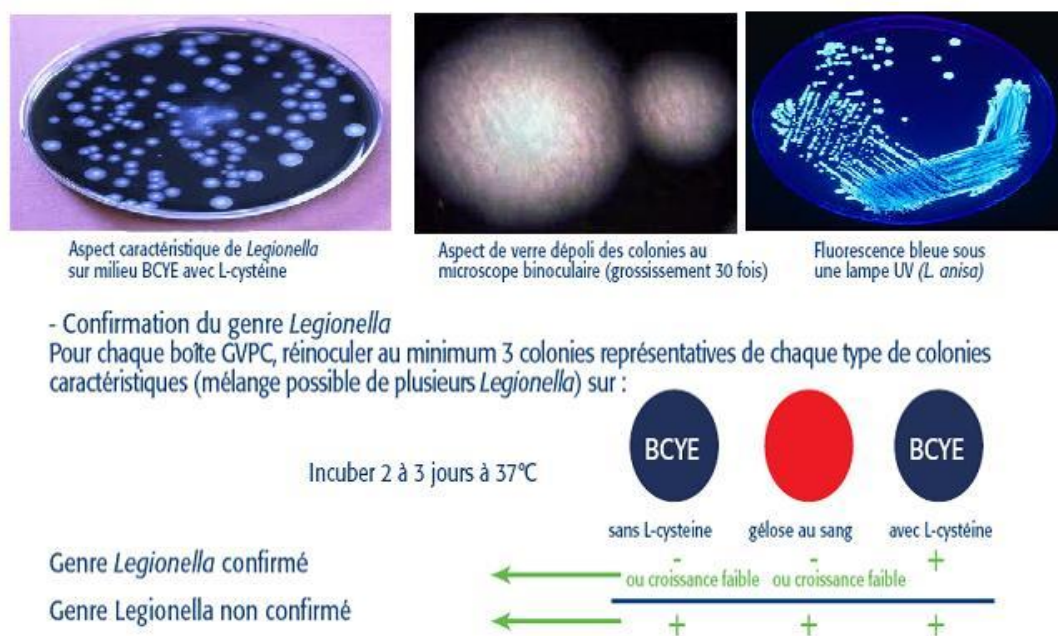
### II.3.4. Ensemencement et incubation :

0.1 mL de la suspension du concentrât de l'échantillon à analyser est déposé puis étalé à la surface du milieu sélectif gélosé GVCP par un étaloir. Par la suite, 0.2mL du concentrât traité (par la chaleur et par l'acide) ont été étalés chacun sur des boîtes de milieu sélectif GVPC (Figure 16). Les boîtes ont été incubées à 37°C avec au moins 2,5% de CO<sub>2</sub> entre 3 et 10 jours.



**Figure 16.** Résumé illustrant les différentes étapes à suivre pour la recherche et le dénombrement de *L. pneumophila*.

Pour la confirmation et l'identification des légionelles, les isolats ont été confirmés sur milieu gélose au sang (Figure 17) et identifiés par un test sérologique d'agglutination en utilisant le kit d'agglutination Latex disponible sur le marché (OXOID *Legionella* Latex Test Kit) (Figure 18).



**Figure 17.** Les différentes étapes de la confirmation présomptive du genre *Legionella*



**Figure 18.** Identification des sérogroupes de *L. pneumophila* par la méthode d'agglutination



Le niveau de contamination par *Legionella* a été déterminé pour tous les bâtiments. Les différents niveaux de contamination sont présentés dans le Tableau II (Directives techniques EWGLI, 2011, Kruse et al., 2016).

**Tableau II.** Définition du niveau de contamination par *Legionella* dans l'eau potable

Niveau de contamination par <i>Legionella</i>	Concentration en <i>Legionella</i> (ufc/100mL)
Pas ou faible niveau de contamination ( <b>Nf</b> )	<b>Nf <math>\leq</math> 100</b>
Niveau de contamination moyenne ( <b>Nm</b> )	<b>100 &lt; Nm <math>\leq</math> 1000</b>
Niveau de contamination élevé ( <b>Ne</b> )	<b>1000 &lt; Ne <math>\leq</math> 10000</b>
Niveau de contamination extrêmement élevé ( <b>Nee</b> )	<b>Nee &gt; 10000</b>

Par la suite, nous avons déterminés la prévalence de *Legionella*, et l'influence d'un certain nombre de facteurs soupçonnés d'être associés à la contamination.

### III. Résultats

#### III.1. Données du questionnaire et caractéristiques des sites d'échantillonnage

Les 118 hôtels ont répondu totalement au questionnaire, les résultats diffèrent d'un établissement à l'autre selon la taille, l'infrastructure et les moyens mise en œuvre pour son activité, pour des raisons de confidentialités les résultats brutes des questionnaires ne sont pas présentés, par contre une synthèse de l'ensemble des données et des résultats de l'enquête sont résumés dans l'Annexe 2.

Les 118 hôtels investigués sont répartis comme suit : 18 hôtels 3 étoiles, 76 hôtels 4 étoiles et 24 hôtels 5 étoiles. La taille des hôtels en nombre de chambres est comprise en 12 est 470 chambres. L'eau froide est généralement fournie par le réseau de distribution publique pour tous les hôtels, toutefois, des hôtels ayant des puits, utilisent les eaux souterraines pour l'arrosage et les piscines.

Sur la base des résultats du questionnaire, sept matériaux de la plomberie ont été couramment utilisés dans les systèmes de distribution d'eau dans l'hôtellerie à savoir, polypropylène copolymère (PPR), acier galvanisé, polychlorure de vinyle (PVC), polychlorure de vinyle surchloré (CPVC), polyéthylène réticulé (PEX-c), acier inoxydable et cuivre. (L'acier inoxydable et le cuivre sont utilisés en partie dans les tuyaux de certains bâtiments étudiés).

L'âge moyen des réseaux a été de 14 ans, mais les systèmes d'eau de certains d'entre eux ont été partiellement rénovés au fil des années. Selon les données recueillies, 35 % des hôtels ont plus de 15 ans, 25% ont entre 10 et 15 ans et 40 % ont été construits au cours des 10 dernières années.

Deux systèmes de production d'eaux chaudes, au niveau des hôtels visités, ont été observé. Le système de production par accumulation et le système de production instantanée. La majorité des hôtels

possèdent un système de production par accumulation bouclé, par contre 3% ont un système de production instantanée et 6% ont les deux systèmes de production.

Le calorifugeage est un paramètre important qui doit être maîtriser, il consiste à isoler des installations de circulation d'eau chaude (tuyauteries, réservoirs, ballons...) afin d'éviter les pertes de chaleur et conserver l'énergie thermique. Parmi les 118 hôtels, 108 ont une tuyauterie intégralement calorifugée, tandis que la tuyauterie de 10 hôtels est partiellement calorifugée.

Concernant l'énergie utilisée pour la production de l'eau chaude sanitaire, le fioul est majoritairement le combustible utilisé, suivi par le propane, l'énergie électrique et solaire, cependant le charbon est utilisé par un seul hôtel parmi ceux investigués.

74% des hôtels utilisent un adoucisseur pour réduire la dureté de l'eau, 36% entament des traitements réguliers soit par le chlore ou par eau de javel (Tableau III). La classe de l'hôtel variait de trois à cinq étoiles, et elle est négativement liée à l'étendue de la colonisation par *Legionella*.

**Tableau III.** L'effet des facteurs environnementaux sur la colonisation par *L. pneumophila* dans les systèmes d'eaux chaudes étudiés.

Paramètres	Variable	Niveau de contamination (x = charge bactérienne UFC/L)			
		Négatif	10 ≤ x < 1000	x ≥ 1000	Total
Classe de l'hôtel	3 étoiles	12 (67%)	0 (0%)	6 (33%)	18 (17%)
	4 étoiles	32 (43%)	07 (9%)	35 (47%)	75 (64%)
	5 étoiles	12 (48%)	04 (16%)	09 (36%)	25 (19%)
L'âge du réseau	> 10 ans	31 (52%)	05 (08%)	22 (37%)	60 (62%)
	≤ 10 ans	25 (43%)	05 (09%)	28 (48%)	58 (38%)
Type de matériaux de la plomberie	Acier galvanisé	17 (44%)	02 (5%)	20 (51%)	39 (33%)
	PVC	06 (50%)	00 (0%)	06 (50%)	12 (10%)
	PPR	27 (52%)	06 (12%)	16 (31%)	52 (44%)
	PEX-c	04 (37%)	01 (09%)	06 (55%)	11 (09%)
	CPVC	02 (50%)	00 (0%)	02 (50%)	04 (04%)
Type de production	Production instantanée	02 (67%)	01 (33%)	00 (0%)	03 (0%)
	Production par accumulation	51 (49%)	09 (9%)	45 (43%)	105 (17%)
	Production accumulation/Instantanée	03 (33%)	02 (22%)	04 (45%)	09 (75%)
La température de l'eau chaude	Température Normale (≥ 55 °C)	12 (86%)	01 (07%)	01 (07%)	14 (17%)
	Température Critique (< 55 °C)	59 (44%)	11 (8%)	65 (48%)	135 (83%)
Adoucisseur	Utilisé	39 (44%)	11 (13%)	38 (43%)	88 (74%)
	Non-utilisé	18 (60%)	08 (27%)	04 (13%)	30 (26%)
Traitement	Oui	17 (40%)	05 (12%)	20 (48%)	42 (36%)
	Non	40 (53%)	36 (47%)	06 (09%)	76 (64%)

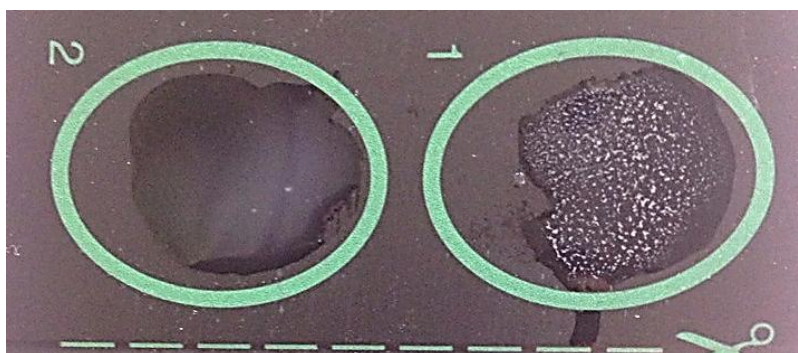
### III.1. Résultats d'analyse et prévalence de *Legionella*

Les colonies caractéristiques de *L. pneumophila* sur le milieu gélosé (GVPC) sont grises, muqueuses, polymorphes et présentent un aspect « verre brisé » sous la loupe binoculaire (Figure 19). Les colonies suspectes ont été repiquées sur des boîtes du milieu sélectif GVPC pendant 2 à 3 jours à 37°C.



**Figure 19.** Aspect de *L. pneumophila* sous la loupe binoculaire

Par ailleurs, l'identification des isolats est réalisée par un test d'agglutination (Figure 20).



**Figure 20.** Résultat du test d'identification des sérogroupes de *L. pneumophila* par la méthode d'agglutination

Sur les 149 échantillons analysés, 77 sont positifs pour *L. pneumophila* avec un pourcentage de 51,7%, dont 84,4% des échantillons positifs comptaient plus de 1000 UFC/L (Tableau IV). Le nombre le plus élevé observé dans la présente étude a été  $7,5 \times 10^4$  UFC/L, isolés d'un système d'eau en acier galvanisé.

**Tableau IV.** Prévalence et niveau de contamination par *L. pneumophila* des échantillons analysés

Echantillons	Nombre des échantillons				Total Positive	Identification	
	Négative	Nombre maximal de <i>Legionella</i> (x) dans l'échantillon (UFC / L)				Lpn sg1	Lpn sg2-15
	X < 10	10 ≤ x < 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> ≤ x < 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> ≤ x < 10 <sup>4</sup>			
Echantillons (n= 149)	72 (48,3%)	12	36	29	77 (51,7%)	23 (29.9 %)	54 (70.1%)

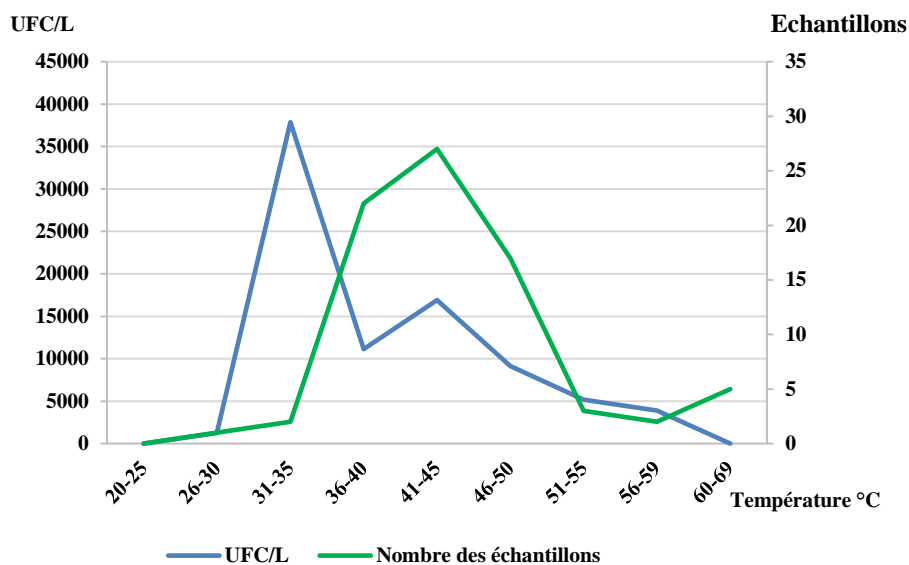
*L. pneumophila* a été détectée dans 56,8% des 118 hôtels visités (Tableau V). Le nombre le plus élevé détecté a dépassé la limite de tolérance (1000UFC/L) dans 86,5%. 61,2% des hôtels contaminés ont un niveau de contamination moyen ou supérieur et 38,8% présente un niveau de contamination extrêmement élevé nécessitant les mesures de désinfection nécessaires (Tableau V).

**Tableau V.** Prévalence et niveau de contamination par *Legionella pneumophila* des systèmes d'eau chaudes des hôtels étudiés (n = 118). La gravité de la colonisation est caractérisée par le nombre maximal détecté dans le bâtiment.

Bâtiments	Nombre des bâtiments				Total Positive	Identification	
	Négative	Nombre maximal de <i>Legionella</i> dans le bâtiment (UFC/L)				Lpn sg1	Lpn sg2-15
	X < 10	10 ≤ x < 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> ≤ x < 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> ≤ x < 10 <sup>4</sup>			
Hotels	51				67	21	50
(n= 118)	(43,2%)	09	32	26	(56.8%)	(31.34%)	(74.62%)

### III.2. Facteurs de risque associés à la contamination

Lors de l'étude des facteurs de risque liés au bâtiment, le facteur de risque le plus important de contamination par *Legionella* est la température de la circulation d'eau chaude. Les niveaux de contamination moyens sont les plus élevés pour des températures comprises entre 31 et 40 °C, et deux fois plus élevés pour des températures entre 51 et 55 °C que pour des températures entre 46 et 50 °C. La température est associée à la fois au niveau de contamination et à la proportion d'échantillons positifs (Figure 21).



**Figure 21.** Relation entre le niveau de contamination moyen par *Legionella* (UFC/ L) (ligne bleue) et nombre d'échantillons prélevés (ligne Verte) à différentes températures de l'eau.

Les installations de plomberie des locaux dans les bâtiments sont des structures complexes, où la distance entre la chaufferie et les robinets éloignés peut atteindre des centaines de mètres. En effet, la température peut être diminuée à des points plus éloignés de la chaufferie ; ce qui rend les conditions favorables pour la colonisation et la prolifération de *Legionella*.

La période de l'année où l'échantillon a été prélevé n'a été pas associés au nombre des échantillons positifs et le niveau de contamination. Toutefois, l'endroit où les échantillons ont été prélevés (les sorties dans la salle de bain, les toilettes, la douche ou les chaudières) et la taille du bâtiment en nombre de chambres ont été associés au niveau de contamination.

#### IV. Discussion

Il est reconnu que la prolifération de *Legionella* dans les systèmes de distribution d'eau provoque un nombre important d'infections avec des niveaux élevés de mortalité (Bartram, 2007). Les systèmes de plomberie sont parmi les sources d'infection reconnues et offrent de multiples conditions favorables au développement de biofilms et de légionelles (Buse et al., 2012). De plus, les systèmes d'eau chaude des établissements résidentiels sont une source bien connue de légionellose (Bornstein et al., 1986; Straus et al., 1996; Pedro-Botet et al., 2002; Roig and Rello, 2003). Des études cliniques prospectives ont démontré un lien direct entre la présence de *Legionella* dans les systèmes d'eau chaude des bâtiments résidentielles, y compris les établissements hôteliers, et l'apparition d'une infection respiratoire par cette bactérie (Kruse et al., 2016; Barna et al., 2016).

Il n'existe actuellement aucune réglementation pour la surveillance et la gestion du risque de *Legionella* au Maroc. Par conséquent, la majorité des systèmes d'eau chaude au niveau national est exploitée sans

aucune prévention et connaissance du risque de *Legionella*. Dans le présent chapitre nous avons réalisée d'une part, une enquête épidémiologique pour évaluer le niveau de contamination par *Legionella* des établissements hôteliers, situés dans les principales villes touristiques du Maroc, et les facteurs de risques associés à la contamination. D'autre part nous avons étudié la prévalence de *Legionella* dans ces établissements hôteliers. *Legionella spp.*, en particulier *L. pneumophila*, étaient largement distribués dans les systèmes d'eau chaude (Robinets et douches). A notre connaissance, ce travail constitue la première analyse de référence au Maroc pour identifier les facteurs associés à la contamination des eaux chaudes et qui peuvent ainsi contribuer à une évaluation préliminaire des risques de *Legionella*.

Dans notre étude, *L. pneumophila* a été isolé dans 51,7% des échantillons d'eau chaude, avec un nombre moyen de cellules dans des échantillons positifs de  $1,17 \times 10^3$  UFC/L. Le nombre le plus élevé de cellules de *L. pneumophila* est de  $7,5 \times 10^4$  UFC/L. Les taux de colonisation étaient supérieurs à ceux observés dans d'autres pays du monde : 4,2% en Grèce, 7,8% en Turquie, 13,5% en Italie, 30% en Finlande et 32% en Allemagne (Erdogan and Arslan, 2007; Napoli et al., 2010; Yu et al., 2008; Leoni et al., 2005; Borella et al., 2004; Mathys et al., 2008), cependant, aucune différence n'a été observée concernant les niveaux de contamination. La plupart des isolats sont des *L. pneumophila* principalement le séro groupe 2-15, ce qui est en accord avec des études faites sur les systèmes d'eau chaude (Borella et al., 2004; Leoni et al., 2005). Selon une enquête menée en Allemagne, *L. pneumophila* est l'espèce la plus abondante dans les échantillons d'eau analysés (Barna et al., 2016).

Les résultats de notre étude montrent qu'il existe un risque important d'exposition à *L. pneumophila* : dans 4 sur 10 bâtiments visités, au moins un niveau moyen de contamination a été observé. Ce niveau représente le seuil auquel des mesures supplémentaires telles que la désinfection et/ou la remise à neuf du système d'eau sont requises. La légionellose est sous-évaluée et l'absence du diagnostic a fait que l'état actuel de la maladie est méconnu et les données sur le taux d'incidence ne sont pas disponibles au Maroc. À l'échelle mondiale, l'incidence réelle est largement inconnue en raison du sous-diagnostic et de la sous-déclaration, mais les données actuelles indiquent que *Legionella* peut être détectée dans 6% des patients hospitalisés pour une pneumonie communautaire (Roysted et al., 2016).

De plus, la dose infectieuse pour *Legionella* demeure incertaine (Whiley et al., 2014) ; cependant, les infections ont le plus souvent été signalées pour des niveaux de contamination supérieurs à 100 ufc/100 mL, mais il faut noter que le risque d'infection dépend également de nombreux facteurs relatifs à la population à risque et à la conception du système d'eau (O'Neill and Humphreys, 2005).

Lors de l'estimation du niveau d'exposition à partir du niveau de contamination, il faut garder à l'esprit que c'est l'exposition aux aérosols qui constitue habituellement le risque de la légionellose (Hines et al., 2014). Dans les établissements hôteliers, cela proviendrait principalement de l'utilisation de douches et, dans une moindre mesure, de vapeurs d'eau très chaude. Bien que les amibes n'ont pas été recherché, leur présence à côté des biofilms, peuvent constituer un réservoir de *Legionella* et protéger le pathogène

contre les agents de désinfection (Cateau et al., 2014). Plusieurs études ont rapporté que l'incidence de la maladie du Légionnaire dépend du degré de contamination du système d'eau, de la susceptibilité des personnes exposées à cette eau, des différences de virulence entre les espèces de *Legionella* et de l'intensité de l'exposition (Erdogan and Arslan, 2015). En outre, une certaine saisonnalité puisse être observée et que cela ait été décrit pour la contamination de l'eau (Rodriguez-Martinez et al., 2015), à notre niveau, aucune relation n'a été trouvée entre la période (mois ou saison) où l'échantillon a été prélevé et le niveau de contamination. Ceci peut suggérer que l'influence de la saison sur l'incidence de la maladie provient de facteurs autres que le niveau de contamination, tels que les modes d'utilisation de l'eau, la susceptibilité de la population, les caractéristiques pathogènes ou d'autres sources d'exposition (van Heijnsbergen et al., 2015). Des études récentes ont toutefois montré que la contamination était constante tout au long de l'année, tant en termes d'espèces de légionelles isolées que de concentrations bactérienne (Dimitriadi and Velonakis, 2014), suggérant que la survenue de la maladie du Légionnaire le plus souvent en été n'est pas nécessairement liée à une contamination élevée de l'eau.

Bien qu'une influence significative du temps de transport du site d'échantillonnage au laboratoire ait été discutée (McCoy et al., 2012; Flanders et al., 2014), aucune influence de ce type n'a été observée dans notre étude. Cependant, des temps de transport excessivement longs (> 24 heures) n'ont pas eu lieu et les temps de transport supérieurs à 8 heures étaient très rares. En termes de la classe de l'hôtels, aucune relation n'a été trouvée entre la classe de l'hôtel (nombre d'étoiles) et la prévalence de *Legionella*.

Les installations de plomberie dans les bâtiments résidentielles sont des structures complexes, où la distance entre la chaufferie et les robinets éloignés peut atteindre des centaines de mètres. Des études antérieures suggèrent que la contamination des systèmes de plomberie est principalement liée à la température de l'eau (Zacheus and Martikainen, 1994; Straus et al., 1996; Kruse et al., 2016), une corrélation positive a été observée entre le niveau de contamination et la température de l'eau chaude, ce qui suggère que la température est parmi les paramètres déterminants qui favorisent la colonisation, la prolifération et la survie de *Legionella* dans les systèmes d'eau chaude. Divers autres paramètres, tels que les matériaux de plomberie, les conditions d'écoulement, la stagnation, la corrosion de canalisation, certains oligo-éléments et la présence d'autres microorganismes sont des facteurs important pour la croissance des légionelles (Serrano-Suarez et al., 2013), alors que d'autres facteurs potentiels de la colonisation de *Legionella*, comme la source d'eau potable, ont jusqu'ici reçu peu d'attention (Vickers et al., 1987; Zacheus and Martikainen, 1994). Le nombre le plus élevé en UFC/L observé dans la présente étude a été détecté d'un système d'eau en acier galvanisé, le PVC et le PPR ont montré également des taux de colonisation relativement élevé, suivi par le PEX-c et le CPVC.

Bien que les réseaux de plomberie offrent des conditions optimales pour la croissance de *Legionella*, seules quelques études ont établi un lien entre les caractéristiques du bâtiment (taille et âge du bâtiment ou du réseau d'eau) et la prévalence de *Legionella* (Alary and Joly, 1991; Borella et al., 2004; Leoni et al., 2005). Les systèmes instantanés de production d'eau chaude (chauffe-eaux électrique ou solaire) ont

montré une prévalence de la colonisation par les légionnelles plus faible que celles semi-instantanées ou par stockage. Les souches de *Legionella* diffèrent par leur sensibilité aux facteurs de risque environnementaux et, en conséquence, peuvent avoir des niches écologiques différentes. A cet effet, des procédures hygiéniques très simples, comme les bonnes pratiques de nettoyage et le remplacement périodique des équipements de plomberie, seraient probablement efficaces pour réduire le nombre des légionnelles dans l'eau. L'introduction de procédures de nettoyage adéquates des salles de bain et l'élévation de la température ( $>55^{\circ}\text{C}$ ) sont très recommandées.

Pour limiter la colonisation de *Legionella* ; il est recommandé de mettre en place un carnet sanitaire, classeur à jour qui permet de regrouper tous les documents de vie de l'installation sanitaire. Ce document doit être accessible mais sous la responsabilité d'une ou d'un groupe de personnes connues même si plusieurs intervenants contribuent à sa mise à jour. Il sera également tenu à la disposition des autorités sanitaires. En plus des suivis de températures et de la réalisation des plans des installations, des opérations de maintenance et de surveillance doivent être mises en place comme le nettoyage des périphériques, le soutirage des chambres peu utilisées et la désinfection. Même si des actions sont toujours possibles en cas de contamination (pose de filtres terminaux, désinfection complète des installations, injection de traitement en continu...), elles doivent être considérées comme ponctuelles, provisoires et aucunement comme des solutions pérennes. La prolifération des légionnelles est symptomatique d'un dysfonctionnement. En cas de contamination sévère, une expertise est nécessaire afin d'avoir une vue globale de l'installation et d'agir de manière exhaustive.

Le dénombrement en *L. pneumophila* doit être inférieur à 1000 unités par litre au niveau de tous les points d'usage à risque. A défaut, le responsable des installations doit prendre immédiatement les mesures correctives nécessaires pour rétablir la qualité de l'eau.

Des prélèvements et des analyses de légionnelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire doivent être réalisés au moins une fois par an par un laboratoire accrédité. La température de l'eau doit être contrôlée également une fois par mois. Les douches, les brumisateurs, les fontaines réfrigérantes ou décoratives, les jacuzzis et les robinets sont les installations à risque les plus concentrés par la bactérie et qui doivent être contrôlées.

## V. Conclusion

La présente étude est un aperçu global du niveau de contamination des réseaux d'eaux chaudes sanitaires au sein des hôtels au Maroc, par *L. pneumophila* et les facteurs de risque associés à la contamination en l'absence de pratiques de gestion du risque de cette bactérie ou de surveillance de routine. Par ailleurs, il est préférable de supposer que tout système donné peut héberger la bactérie *Legionella* et que des pratiques de contrôles microbiologiques continues doivent être mises en œuvre pour minimiser le risque de prolifération et de croissance de ce pathogène.



Dans le volet de la communication sur le risque nous avons décidé d'informer les principaux acteurs concernés par la problématique, de les aider et de les inciter à prendre en compte l'ensemble des facteurs de risque, tant dans le choix des implantations nouvelles, que dans la gestion des installations existantes, et ce, pour réduire le risque d'expositions de personnes aux légionelles à travers un guide de gestion du risque lié aux légionelles.



✓ **Questionnaire : Investigation des installations à risques**

- 7 types de matériaux de la plomberie sont principalement utilisés à savoir l'Acier galvanisé, l'acier inoxydable, le PVC, le PPR, le PEX-c, le CPVC et le Cuivre.
- 70% des établissements ne tiennent pas en compte le problème des légionelles.
- 35% des hôtels ont plus de 15 ans, 25% entre 10 et 15 ans et 40% ont été construits au cours des 10 dernières années.
- 74% des établissements utilisent un adoucisseur.
- 36% entament des traitements par le chlore ou par la filtration.

✓ **Echantillonnage : Campagne des prélèvements / Prévalence**

- Une centaine d'hôtels ont été étudiée appartenant aux principales villes touristiques du Maroc entre janvier 2015 et Avril 2018.
- 56,8% des hôtels sont colonisés par *L. pneumophila*.
- 51,7% des échantillons sont positifs à *L. pneumophila*.
- Le sérotype le plus isolé est *L. pneumophila* sg 2-15 (54 *Lpn* sg 2-15 et 23 *Lpn* sg 1).
- 84,4% des échantillons positifs dépassent la limite de tolérance (1000 UFC/L).
- La température de l'eau chaude dans les bâtiments étudiés est généralement au-dessous des recommandations mondiales (>55°C).
- La température de circulation d'eau chaude sanitaire, zone de prélèvement et la taille du bâtiment sont associés au niveau de contamination et la proportion d'échantillons positifs.

## Chapitre II. Susceptibilité des souches de *Legionella* spp. aux antibiotiques

### I. Introduction

Le genre *Legionella* comporte environ 60 espèces et plus de 73 sérogroupes (Diederer, 2008; De Giglio et al., 2015). Parmi ces espèces, on trouve *L. pneumophila*, la plus impliquée dans la maladie des légionnaires et responsable de 91,5% des infections humaines, en particulier le sérotype 1 qui est l'agent le plus pathogène, provoquant la majorité des maladies des légionnaires (84,2%) (Guyard and Low, 2011; Alexandropoulou et al., 2015).

Historiquement, l'érythromycine était le premier antibiotique prescrit (Pedro-Botet and Yu, 2009). Actuellement, Les macrolides et les fluoroquinolones sont les antibiotiques les plus couramment utilisés pour le traitement de la légionellose, en raison de leur plus grande activité in vitro et de leur bonne pénétration intracellulaire (Pedro-Botet and Yu, 2009). De plus, dans les cas sévères de maladie des légionnaires, la rifampicine est le plus souvent utilisée en association avec d'autres antibiotiques. Cependant, certaines études ont rapportés un échec thérapeutique chez les patients atteints de légionellose recevant un traitement avec ces antibiotiques (Blazquez Garrido et al., 2005; Erdogan et al., 2010).

Au Maroc, il n'y a pas assez de données sur les isolats cliniques et environnementaux à propos de l'évaluation de l'activité in vitro des agents antimicrobiens. À notre connaissance, notre étude est la première enquête sur la sensibilité aux antibiotiques des souches environnementales de *Legionella* au Maroc. Le but de ce travail est de déterminer le niveau de susceptibilité aux antibiotiques des souches environnementales de *L. pneumophila* sg1, *L. pneumophila* sg2-15 et *L. anisa* isolées à partir des systèmes d'eau chaude des établissements hôteliers au Maroc.

### II. Matériel et méthodes

#### II.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Soixante souches de *Legionella* isolées des systèmes d'eau des établissements hôteliers ont fait l'objet de cette étude dont 20 *L. pneumophila* sg1 (33,33%), 38 *L. pneumophila* sg2-15 (63,33%) et 2 *L. anisa* (3,33%). Tous les isolats de *Legionella* ont d'abord été sérologiquement identifiés par le test d'agglutination au latex en utilisant un kit commercial (OXOID *Legionella* Latex Test Kit), puis conservées à -80 °C.

#### II.2. Agents antimicrobiens

Pour cette étude douze antibiotiques ont été testés : Macrolides (Erythromycine (ERY), Azithromycine (AZI) et Clarithromycine (CLA)), Fluoroquinolones (Ciprofloxacin (CIP), Levofloxacin (LEV), Moxifloxacin (MOX), et Gemifloxacin (GEM)), le kétolide (télithromycine (TELI)), le céfotaxime (CEF), la tigécycline (TIG), la doxycycline (DOX) et la rifampicine (RIF).

### II.3. Test de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de microdilution

La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée par microdilution dans le bouillon d'extrait de levure tamponnée (BYE) additionné de 0,04% de L-cystéine et par l'utilisation des plaques de microtitration à 96 puits. Les isolats de *Legionella* ont été cultivés sur gélose Glycine, Vancomycine, Polymyxine B et Cycloheximide (GVPC) et incubés pendant 48h à 37 °C  $\pm$  2,5% de CO<sub>2</sub>. Une suspension de chaque souche a été préparée dans un bouillon BYE et la turbidité a été ajustée à une densité optique équivalente à 0,5 McFarland. Des dilutions en série d'antibiotiques ont été préparées dans du bouillon BYE (50  $\mu$ L) et ajoutées à un volume égal d'inoculum dans chaque puits. Après une incubation de 48h à 37 °C  $\pm$  2,5% de CO<sub>2</sub>, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme le premier puits sans croissance visible (Stout et al., 2005). Tous les tests ont été effectués en double et les résultats ont été exprimés en tant que moyenne des deux valeurs. Comme peu d'informations ont été publiées sur la sensibilité des souches de *Legionella* aux antibiotiques, nous avons utilisé *L. pneumophila* ATCC33152 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comme souches témoins. Les souches sélectionnées ont été congelées à -80 °C avant l'analyse. Le bouillon BYE et Mueller Hinton ont été utilisés pour tester les bactéries témoins. Tous les antibiotiques ont été macro-dilués dans des tubes et distribués en utilisant une pipette multicanaux.

### III. Résultats

Les pourcentages cumulés de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> des soixante souches de *Legionella* inhibés par différentes concentrations des douze antibiotiques sont présentés dans les Tableaux VI. Le Tableau VII présente les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>, l'intervalle des CMI des douze antibiotiques testés pour toutes les souches de *Legionella*.

Les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> pour les fluoroquinolones (CIP, LEV, GEM et MOX) variaient de 0,047 à 3. En particulier, elles sont respectivement 0,19 et 0,75 mg/L (intervalle 0,047-1,5) pour la CIP, 0,25 et 0,5 mg/L, respectivement, (intervalle 0,064-3) pour MOX, 0,25 et 0,5 mg/L, respectivement, (intervalle 0,047-1,5) pour GEM, et 0,064 et 0,38 mg/L, respectivement, (intervalle 0,047-1) pour LEV.

Les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> pour les macrolides (AZI, CLA et ERY) variaient de 0,032 à 2. En particulier, elles sont de 0,25 et 0,75 mg/L, respectivement, (intervalle 0,064-2) pour ERY, 0,19 et 0,5 mg/L, respectivement, (intervalle 0,047-1,5) pour AZI, et 0,094 et 0,5 mg/L, respectivement, (intervalle 0,032-1) pour CLA.

Les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> pour CEF sont respectivement de 2 et 3 mg/L (intervalle 0,25-6), 1,5 et 3 mg/L (intervalle 0,125-6) pour TIG, 0,5 et 3 mg/L, respectivement, (intervalle 0,19-4) pour TELI, 2 et 4 mg/L, respectivement, (intervalle 0,19-8) pour DOX qui est l'antibiotique le moins active. La RIF est l'antibiotique le plus actif, avec une CMI<sub>50</sub>=0,032 mg/L et une CMI<sub>90</sub>=0,064 mg/L (Intervalle 0,016-0,25).

**Tableau VI.** Les valeurs cumulatives des CMI relatives à la sensibilité des soixante souches aux antibiotiques testés

Antibiotics	Cumulative % of strains inhibited at indicated concentrations (mg L <sup>-1</sup> )																		Range (mg L <sup>-1</sup> ) of susceptibility	MIC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	MIC <sub>90</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
	0,016	0,032	0,047	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5	0,75	1	1.5	2	3	4	6	8			
Azithromycine			13.3	21.7		41.7	48.3	56.7	76.7	90	98.3		100						0.047-1.5	0.19	0.5
Céfotaxime								20		31.7	41.7			75	90	98.3	100		0.25-6	2	3
Ciprofloxacine			6.7	16.7		46.7	56.7			81.7	96.7		100						0.047-1.5	0.19	0.75
Clarithromycine	3.33			40	50			78.3	83.3	93.3	98.3	100							0.032-1	0.094	0.5
Doxycycline							5	16.7		28.3	40		48.3	60	80	91.7	95	100	0.19-8	2	4
Erythromycine				3.33	18.3		46.8	50		71.7	91.7	96.7		100					0.064-2	0.25	0.75
Gémifloxacine			15	28.3		45		70	81.7	98.3			100						0.047-1.5	0.25	0.5
Lévofloxacine			3.33	58.3	68.3		76.7	85	90		93.3	100							0.047-1	0.064	0.38
Moxifloxacine				46.7	18.3		36.7	50		93.3	95		98.3		100				0.064-3	0.25	0.5
Rifampicine	5	51.7		95	96.7		98.3	100											0.016-0.25	0.032	0.094
Télithromycine							25	38.3		51.7	75	76.7		85	96.7	100			0.19-4	0.5	3
Tigécycline						1.7		6.7	23.3	38.3	48.3		63.3	83.3	95		100		0.125-6	1.5	3

Pour *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15, les valeurs de CMI de RIF, CLA et fluoroquinolones ont montré une forte activité que AZI, ERY, TELI, TIG, DOX et CEF. Les valeurs de CMI de CIP, TIG et AZI sont plus faibles pour *L. pneumophila* sg2-15 que pour *L. pneumophila* sg1. Le MOX a montré une activité élevée contre *L. pneumophila* sg1 que sur *L. pneumophila* sg2-15.

Les valeurs de CMI de la RIF contre *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 sont les plus faibles. Pour ERY, les valeurs de la CMI sont similaires pour les deux souches (*L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15). Tous les antibiotiques testés ont montré une activité élevée contre *L. anisa* par rapport à *L. pneumophila* (Tableau VIII).

**Tableau VII.** Les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> des douze antibiotiques testés contre les soixante souches

Antibiotiques	<i>L. pneumophila</i> sg1 (n=20)			<i>L. pneumophila</i> sg2-15 (n=38)			<i>Legionella anisa</i> (n=2)		
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervalle	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervalle	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervalle
Azithromycine	0,125	0,38	0,064-1,5	0,19	0,5	0,047-0,75	0,064	0,25	0,064-0,25
Céfotaxime	2	3	0,5-6	0,5	3	0,25-4	0,5	1	0,5-1
Ciprofloxacine	0,125	0,75	0,064-1,5	0,19	0,5	0,047-0,75	0,19	0,5	0,19-0,5
Clarithromycine	0,094	0,25	0,032-1	0,064	0,38	0,032-0,75	0,064	0,094	0,064-0,094
Doxycycline	2	4	0,19-8	1,5	4	0,19-8	2	2	2-2
Erythromycine	0,25	0,75	0,19-2	0,19	0,75	0,064-0,75	0,094	0,25	0,094-0,25
Gémifloxacine	0,25	0,5	0,047-1,5	0,125	0,38	0,047-0,5	0,094	0,19	0,094-0,19
Lévofloxacine	0,064	0,25	0,064-1	0,064	0,38	0,047-1	0,094	0,19	0,094-0,19
Moxifloxacine	0,25	0,5	0,19-3	0,25	0,5	0,064-1,5	0,19	0,75	0,19-0,75
Rifampicine	0,032	0,094	0,016-0,25	0,032	0,064	0,016-0,19	0,032	0,064	0,032-0,064
Télithromycine	0,5	2	0,19-4	0,25	2	0,19-3	0,25	0,5	0,25-0,5
Tigécycline	3	6	0,38-6	0,75	3	0,125-3	1	2	1-2

## VI. Discussion

La surveillance environnementale de *Legionella* est essentielle pour prévenir et minimiser l'infection par cette bactérie pathogène, ainsi que pour identifier tout changement dans la susceptibilité aux antimicrobiens. À l'heure actuelle, on sait peu de choses sur la susceptibilité de *Legionella* aux antimicrobiens (Xiong et al., 2016). Bien que *L. pneumophila* sg1 est l'agent causale de la majorité des cas de légionellose (Guyard and Low, 2011), d'autres sérogroupes et espèces comme *L. pneumophila* sg2-15 (Sandalakis et al., 2014) et *L. anisa* (Tanabe et al., 2009) ont montré leur implication dans la pneumonie ou la fièvre de Pontiac. Dans la présente étude, nous avons testé pour la première fois au Maroc la sensibilité des souches environnementales de *Legionella* à douze antibiotiques souvent utilisés pour le traitement de la légionellose. La croissance des souches étudiées a été inhibée par de faibles concentrations d'antibiotiques.

Conformément à des études antérieures, la RIF est l'antibiotique le plus efficace contre les isolats de *L. pneumophila* et *L. anisa* (CMI : 0,016-0,25) (Sandalakis et al., 2014; Erdogan et al., 2010). Malgré sa forte activité, l'utilisation de la rifampicine en monothérapie contre *Legionella* augmente la possibilité de développement d'une résistance bactérienne, pour cela, son association avec d'autres antibiotiques est recommandée chez les patients atteints de légionellose sévère (Varner et al., 2011; Erdogan et al., 2010).

Les antibiotiques de la famille des macrolides ont montré, quant à eux, une activité importante mais moins que celle de la rifampicine. Conformément à une étude antérieure, la clarithromycine est plus active que l'azithromycine et l'erythromycine contre tous les isolats (Stout et al., 2005). Les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de l'AZI et l'ERY dans notre étude sont plus élevées que celles rapportées en Chine par Xiong et al. (2016). L'explication la plus probable de cette différence semble être l'origine géographique des souches. Les valeurs de CMI des macrolides sont plus faibles pour les souches de *L. anisa* et de *L. pneumophila* sg2-15 que pour *L. pneumophila* sg1.

À ce jour, les fluoroquinolones sont devenues les antibiotiques les plus largement utilisés pour le traitement des infections des voies respiratoires inférieures en raison de leur couverture à large spectre, de leur facilité d'administration et de leurs effets indésirables relativement moins nombreux (Erdogan et al., 2010). Conformément à d'autres rapports (Stout et al., 2005; De Giglio et al., 2015), les valeurs de CMI<sub>90</sub> de notre étude indiquent que les isolats de *L. pneumophila* sont plus sensibles au LEV. Les Fluoroquinolones ont une plus grande activité contre les souches de *Legionella* par rapport aux macrolides (Sandalakis et al., 2014; Stout et al., 2005). En revanche, d'autres études ont rapporté que les activités des fluoroquinolones vis-à-vis *L. pneumophila* sont similaires à celles des macrolides en se basant sur les valeurs de CMI<sub>90</sub> (De Giglio et al., 2015). Ces différences peuvent être attribuées à la répartition géographique et aux méthodes utilisées pour tester la sensibilité aux antibiotiques, ajouter facteur relative à la bactérie).

La Tigécycline (intervalle CMI : 0,125-6) et la doxycycline (intervalle CMI : 0,19-8) constituent clairement les deux antibiotiques les moins efficaces contre *L. pneumophila* et *L. anisa* (Tableau VI). La CEF est plus actif que la TIG et la DOX dans l'ordre suivant CEF> TIG> DOX. Les CMI de TGC, DOX et CEF sont plus élevées que celles des autres antibiotiques testés.

Dans notre étude, les valeurs de CMI de l'AZI, DOX et TGC sont inférieures à celles des CMI indiquées par De Giglio et al. (2015) ; l'explication probable de ce résultat peut être les différentes origines de souches ou l'utilisation de différentes méthodes pour tester la susceptibilité aux antibiotiques.

Aucune différence systématique de CMI n'a été observée entre *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 pour l'Erythromycine et la Télithromycine (Tableau VII). En revanche, les valeurs de CMI pour les autres antibiotiques sont plus faibles pour les souches de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15. Les valeurs de la CMI<sub>90</sub> de la majorité des antibiotiques sont plus faibles pour *L. anisa* que pour *L. pneumophila* (Tableau VII). De plus, la sensibilité aux antibiotiques par *L. pneumophila* sg2-15 est légèrement plus élevée que celle de *L. pneumophila* sg1, ce qui est en accord avec les travaux de (Sandalakis et al., 2014). De plus *L. pneumophila* sg1 est moins sensible à la majorité des antibiotiques par rapport à *L. anisa* et *L. pneumophila* sg2-15 conformément aux résultats publiés ultérieurement (Gomez-Lus et al., 2001) (Tableau VII).

Diverses méthodes ont été utilisées pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques de *Legionella*, comme la microdilution en bouillon et en agar, les E-tests et la diffusion des disques (Bruin et al., 2012; De Giglio et al., 2015; Sandalakis et al., 2014; Xiong et al., 2016; Stout et al., 2005). Aucune de ces méthodes ne constitue une techniques de référence, certaines études ont rapporté que l'utilisation d'une méthodologie différente conduit à une variabilité dans la gamme des valeurs de CMI (Garcia et al., 2000; De Giglio et al., 2015). Il est connu que la méthode des E-test donne des valeurs de CMI plus élevées que d'autres méthodes (Alexandropoulou et al., 2013).

Plusieurs études ont montré que le charbon ou d'autres composants de la gélose BCYE peuvent inhiber divers antibiotiques, y compris les fluoroquinolones et les macrolides (Marques and Piedade, 1997; Garcia et al., 2000; Gomez-Lus et al., 2001; Erdogan et al., 2010; Sandalakis et al., 2014). Comme il n'y a pas de recommandations spécifiques pour les tests de sensibilité de *Legionella*, nous avons utilisé la méthode de dilution en BYE pour éviter toute inactivation des antibiotiques par le charbon. Certains auteurs indiquent que l'utilisation de BYE (sans charbon) au lieu de BCYE peut être une bonne option pour effectuer des tests de sensibilité de *Legionella* aux antimicrobiens (Gomez-Lus et al., 2001; Erdogan et al., 2010). Dans l'ensemble, les résultats de cette étude sont comparables à ceux des travaux antérieurs où la même méthode de dilution en BYE a été utilisé (Stout et al., 2005; Erdogan et al., 2010).

En général, les résultats de la sensibilité aux antibiotiques obtenus avec l'une ou l'autre méthode doivent être interprétés avec prudence. Il faut considérer que les tests in vitro des agents antibiotiques sont parfois faiblement corrélés avec l'efficacité clinique, car la localisation intracellulaire des

microorganismes peut les protéger d'une thérapie antimicrobienne efficace (Marques and Piedade, 1997; De Giglio et al., 2015).

Les légionelles dans les systèmes d'eau environnementaux peuvent être exposées à des agents antimicrobiens provenant de la pratique médicale ou vétérinaire, ou à ceux sécrétés par d'autres micro-organismes (Almahmoud et al., 2009). Par conséquent, la présence de ces antibiotiques dans l'environnement peut favoriser le développement d'une résistance bactérienne (D'costa et al., 2006); ce qui peut augmenter le risque d'échec d'un traitement antibiotique chez les patients atteints de la légionellose. En effet, la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des souches environnementales de *Legionella* est essentielle pour évaluer l'émergence possible d'une résistance bactérienne.

## V. Conclusion

Dans notre étude 60 souches de *Legionella* ont fait l'objet de l'étude de susceptibilité à 12 antibiotiques couramment prescrit pour le traitement de la maladie des légionnaires. Aucune résistance aux antibiotiques n'a été observé pour les souches étudiées. En effet, toutes les souches sont inhibées par de faibles concentrations d'antibiotiques. La rifampicine est l'antibiotiques le plus actif contre les souches étudiées.

Les tests de susceptibilité de *Legionella* aux antibiotiques doivent être surveillés fréquemment pour détecter et évaluer la résistance possible aux antibiotiques des souches environnementales et des isolats cliniques. Ces données pourraient être utiles pour améliorer les résultats relatifs aux traitements, contribuer au meilleur choix d'une thérapie pour les patients et réduire les coûts directs associés à l'hospitalisation.



### ✓ Sensibilité aux antibiotiques

- Aucune résistance aux antibiotiques n'a été observé pour les souches étudiées.
- Toutes les souches sont inhibées par de faibles concentrations d'antibiotiques.
- La rifampicine est l'antibiotiques le plus actif contre les souches étudiées.
- Les CMI's les plus élevées ont été observé pour *L. pneumophila* sg 1.



## Chapitre III. Caractérisation moléculaire des souches de *L. pneumophila*

### I. Introduction

Les méthodes de typage moléculaire sont utilisées non seulement pour les enquêtes épidémiologiques sur la légionellose afin de déterminer les sources d'infection, mais également pour déterminer la distribution des souches de *L. pneumophila* dans des zones spécifiques (Borchardt et al., 2008; Chasqueira et al., 2009; Harrison et al., 2009; Kozak-Muiznieks et al., 2014). A cet effet, plusieurs méthodes de typage phénotypiques et génotypiques ont été élaborées et appliquées au typage épidémiologique de *L. pneumophila*.

Le typage phénotypique est généralement réalisé par la technique des anticorps monoclonaux (Mabs), toutefois, le typage génotypique est réalisé par plusieurs techniques moléculaire dont le principe repose sur la variabilité des acides nucléiques des isolats, à savoir la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), la NGS (New Generation Sequencing) et le SBT (Sequence-Based Typing) (Fields et al., 2002b; Hilbi et al., 2010).

Brièvement, le typage phénotypique par la technique des anticorps monoclonaux (Mabs) cible des LPS de la membrane externe des légionelles. Les autres méthodes moléculaires sont basées sur la diversité des acides nucléotidiques des isolats et sur des méthodes de digestion enzymatique, d'amplification spécifique, de migration (PFGE et AFLP) et de séquençage (SBT, NGS). L'AFLP à l'avantage d'être simple d'utilisation et rapide (entre 24 et 48 heures) (Fry et al., 2000). Bien que cette méthode soit normalisée au niveau international, son utilisation diminue par rapport aux autres techniques. La PFGE est la méthode de typage la plus utilisée pour le typage de *Legionella* (Furuhata et al., 2014). Néanmoins cette méthode est consommatrice de temps et coûteuse en termes de matériel nécessaire pour sa réalisation. La technique SBT développée par le groupe européen EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) est caractérisée par sa reproductibilité mais elle est moins efficace que la PFGE pour la discrimination des souches de *Legionella* (Ratzow et al., 2007).

Le but de cette étude est de décrire les caractéristiques moléculaires de 20 souches de *L. pneumophila* sg1 isolées au Maroc. Ce travail a été réalisé au Centre National de référence des Légionelles à Lyon en France.

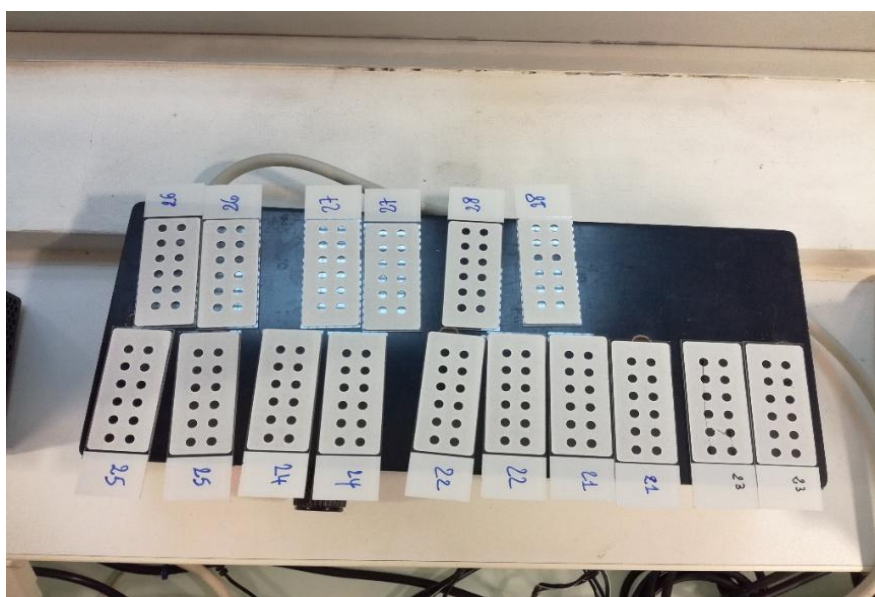
### II. Matériel et méthodes

#### II.1. Bactéries et conditions de culture

Les souches de *L. pneumophila* sg1 (n=20) isolées à partir des réseaux d'eau chaude sanitaire des établissements hôteliers ont été considérées dans cette l'étude. Les souches stockées à -80 °C ont été cultivées sur milieu solide GVPC (BioMérieux, France) à 36°C pendant 2 jours.

## II.2. Typage phénotypique par les Mabs

Les 20 souches de *L. pneumophila* sg1 ont été typées sérologiquement par des anticorps monoclonaux, selon le panel de MAb de Dresden (Helbig et al., 1997; Helbig et al., 2002). Des lames de 18 puits ont été préparées pour faire ce test. 10 µl de la suspension bactérienne a été déposé dans les puits correspondants, par la suite les lames ont été séchées à l'étuve puis fixées sur platine pendant une heure minimum. Les anticorps ont été déposés sur les puits (10µl). Après incubation 3 à 4 heures à l'étuve en chambre humide, les lames ont été lavés par le PBS pendant 10 min. Après séchage, le Dako a été étalé sur tous les puits de la lame (Dako anti-souris au 1/100) et les lames ont été incubés pendant 30min et lavé par la suite avec du PBS. Après séchage, les lames ont été observé par la technique d'immunofluorescence. Des lames témoins ont été également réalisées (Figure 22).



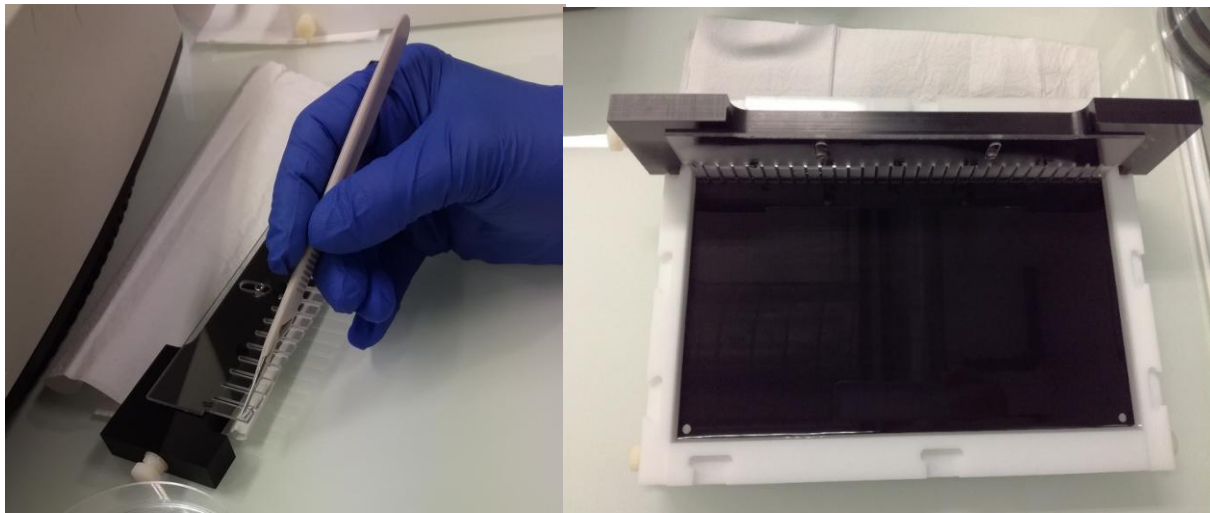
**Figure 22.** Lame 18 puits de la souche à étudier

## II.3. Typage génotypique par la PFGE

Le typage moléculaire des isolats de *L. pneumophila* sg1 est réalisé par la méthode d'électrophorèse sur gel en champ pulsé décrite précédemment par Ginevra et al. (2009). Les isolats ont été traités avec de la protéinase K (50 mg/mL) dans un tampon TE (Tris-HCl 10 mM et EDTA 1 mM, pH 8) pendant 24 h à 55°C, et l'ADN a été digéré avec 20 µl d'enzyme de restriction *Sfi*I (Roche Diagnostic, Meylan, France) pendant 16h à 50°C (Figure 23).

Les fragments d'ADN ont été séparés dans un gel d'agarose à 0,8% déjà préparé. La Migration a été effectuée dans d'une cuve (système CHEF DRII, Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) remplie du tampon Tris-borate-EDTA 0,5x (pH 8,3), avec des temps de pulse croissants (2 à 25 s) à 150 volts pendant 11h à 10°C, et 35 à 60 s à 150 volts pendant 9h à 10 °C. Ensuite, le gel a été coloré pendant 30 minutes avec

une solution de Gel-red. Les pulsotypes ont été interprétés selon les critères de Tenover et al. (1995) et les profils de restriction ont été analysés avec le logiciel BioNumerics (Applied Maths N.V.).



**Figure 23 :** Préparation des plugs et du gel de migration

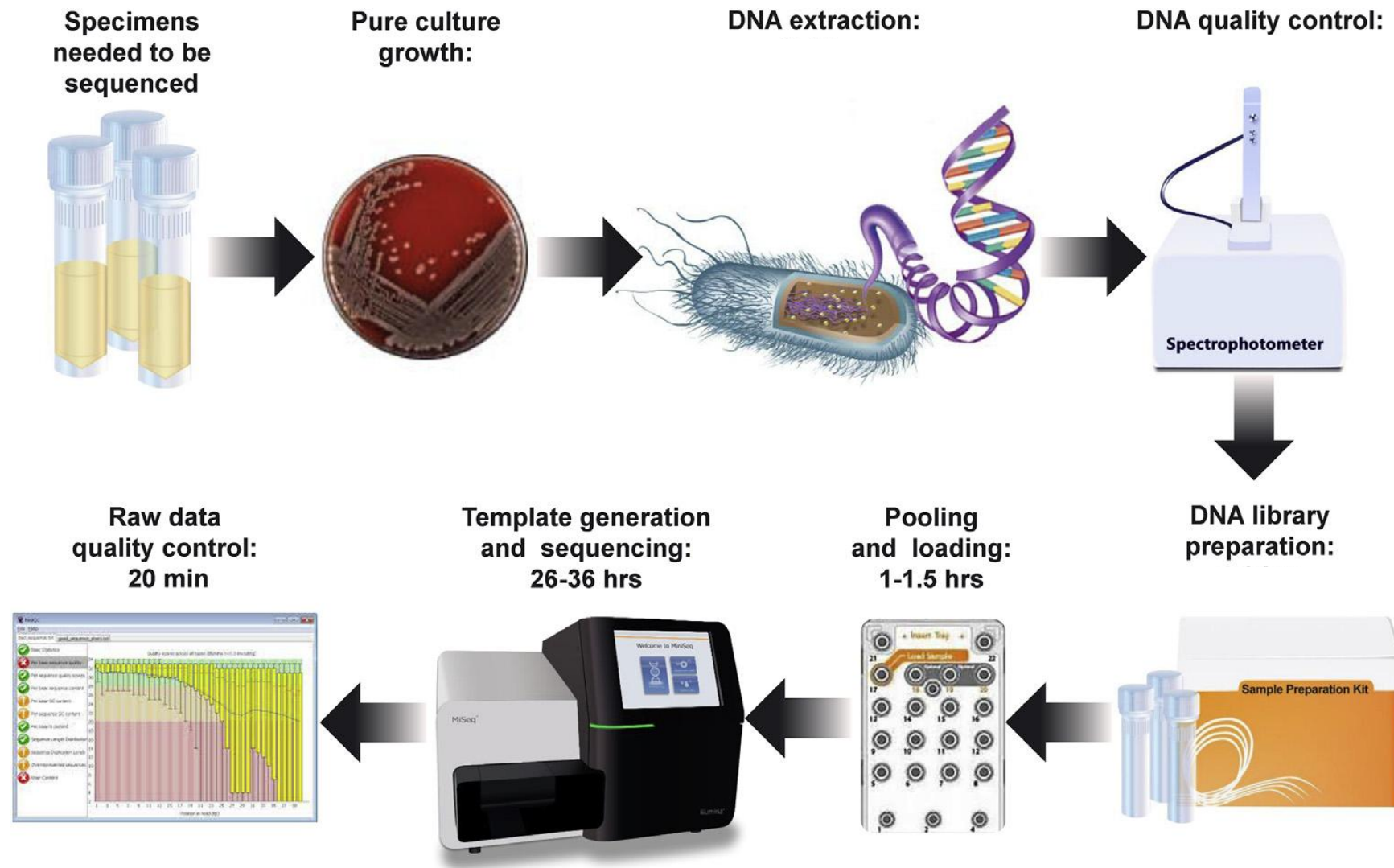
#### II.4. Séquençage total du génome : New Generation Sequencing (NGS)

Le génotypage a été réalisé via le séquençage total du génome en utilisant la méthode de New Generation sequencing (NGS). L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit Maxwell (Promega, Madison, USA) conformément au protocole du fabricant et le séquençage a été effectué via le séquenceur Illumina meiq (Illumina NextSeq 500, California, USA).

Pour faire l'extraction de l'ADN, 300 µl d'une suspension bactérienne (DO= 1 à 560 nm) est additionnée de 300µL de tampon de lyse et 30 µL de la Protéinase K dans un tube conique de 1,5ml. Le tube est remis dans un bain sec à 50 °C pendant au moins 30 min. Après ce temps, 4µl de Rnase est ajouté à la suspension. La totalité de la suspension est remis dans le dernier puits des barrettes du kit Maxwell, et les cônes dans le premier puits avec les tubes d'élution (tampon d'élution 200µl). Après extraction, l'ADN est séquençé par la technique de NGS (Figure 24).

Le génome total séquençé et la base de données SBT ont été utilisés pour attribuer le numéro d'allèle spécifique correspondant au 7 gènes (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* et *neuA*). Pour chaque isolat, la combinaison de ces sept allèles au niveau de chacun des locus a été définie comme étant le profil allélique ou SBT en utilisant l'ordre prédéterminé : *fla*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* et *neuA*.

Un numéro ST (Sequence Type) est alors attribué, qui est caractéristique de l'isolat. Ces séquences sont répertoriées dans une banque de données accessible sur le site de groupe EWGLI ([www.ewgdl.org](http://www.ewgdl.org)). De nouvelles combinaisons de numéros alléliques ont également été soumises à l'EWGLI pour l'attribution de nouveaux numéros ST.

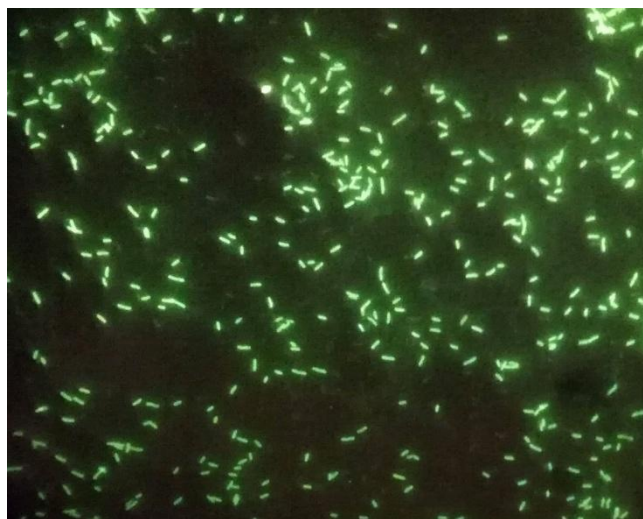


**Figure 24 :** Schéma général de la technique New Generation Sequencing (Besser et al., 2018).

### III. Résultats

#### III.1. Typage phénotypique par les Mabs

Les résultats du typage phénotypique par les Mabs sont résumés dans le Tableau IX et la Figure 26. Le typage par les Mabs a démontré une prévalence ( $n = 100\%$ ) des isolats positifs pour l'épitope MAb 3/1 négatif (Figure 25). Parmi les 20 isolats de *L. pneumophila* sg1, 6 souches appartenant au sous-groupe de Camperdown (0,33%), 7 Oxford (0,35%) et 6 OLDA (0,33%).

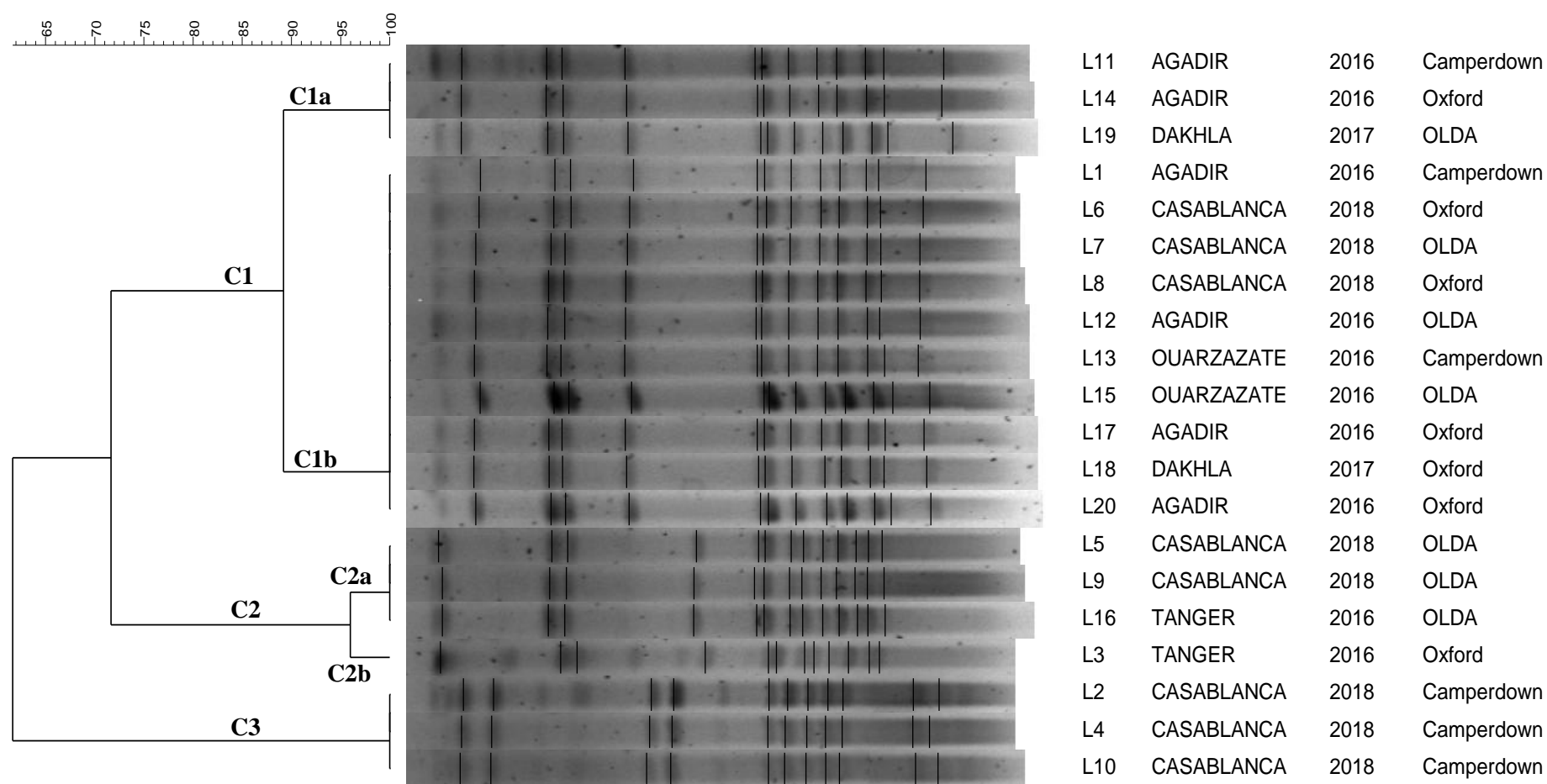


**Figure 25 :** Résultat positif d'anticorps monoclonaux par la technique d'immunofluorescence

#### III.2. Analyse PFGE

Les profils PFGE après digestion avec *Sfi*I obtenus à partir des 20 souches de *L. pneumophila* sg1 sont présentées à la Figure 26. Selon les critères de Tenover et al. (1995) et sur les 20 souches environnementales, trois clones différents ont été obtenus, dont certains sont présents au niveau de plusieurs établissements dans différentes villes du royaume (Figure 26).

Le clone C1 est constitué de 2 sous-clones C1a et C1b. Il comprend 13 souches, isolées à partir de 4 villes pendant 3 différentes années (Figure 26). Le clone C2 comprend également deux sous-clones C2a et C2b, répartis entre 4 établissements à Casablanca et Tanger. Le clone C3 est retrouvé seulement sur Casablanca au niveau de 3 établissements.



**Figure 26 :** Dendrogramme de l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) analyse des clusters de 20 souches de *L. pneumophila* sg1. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths N.V.).



### III.3. NGS et Analyse SBT

Les résultats de l'analyse SBT et la détermination du "sequence type" (ST) sont donnés dans le Tableau IX. Trois ST ont été identifiés avec une fréquence élevée de ST1 (13 souches, 65%), suivi par ST560 (4 souches, 20%). Un nouveau ST a été enregistré chez 3 souches (15%) auquel ESGLI a attribué le numéro ST2897. Ces trois souches ont été isolées dans la ville de Casablanca durant l'année 2018.

La combinaison entre les résultats des analyses SBT et Mabs révèle 46% des ST1 sont des Oxford, 23% des Camperdown et 31% des OLDA. Camperdown représente 100% des ST ST2897. Cependant, OLDA représente 75% des souches ST560 suivi de Oxford à 25%.

**Tableau VIII :** Répartition des profils SBT des 20 *L. pneumophila* sg1.

Isolats	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	ST	MABs	Ville
L1	1	4	3	1	1	1	1	1	Camperdown	AGADIR
L2	6	7	14	28	4	4	13	ST2897	Camperdown	CASABLANCA
L3	1	4	3	1	1	30	1	560	Oxford	TANGER
L4	6	7	14	28	4	4	13	ST2897	Camperdown	CASABLANCA
L5	1	4	3	1	1	30	1	560	OLDA	CASABLANCA
L6	1	4	3	1	1	1	1	1	Oxford	CASABLANCA
L7	1	4	3	1	1	1	1	1	OLDA	CASABLANCA
L8	1	4	3	1	1	1	1	1	Oxford	CASABLANCA
L9	1	4	3	1	1	30	1	560	OLDA	CASABLANCA
L10	6	7	14	28	4	4	13	ST2897	Camperdown	CASABLANCA
L11	1	4	3	1	1	1	1	1	Camperdown	AGADIR
L12	1	4	3	1	1	1	1	1	OLDA	AGADIR
L13	1	4	3	1	1	1	1	1	Camperdown	OUARZAZATE
L14	1	4	3	1	1	1	1	1	Oxford	AGADIR
L15	1	4	3	1	1	1	1	1	OLDA	OUARZAZATE
L16	1	4	3	1	1	30	1	560	OLDA	TANGER
L17	1	4	3	1	1	1	1	1	Oxford	AGADIR
L18	1	4	3	1	1	1	1	1	Oxford	DAKHLA
L19	1	4	3	1	1	1	1	1	OLDA	DAKHLA
L20	1	4	3	1	1	1	1	1	Oxford	AGADIR

#### IV. Discussion

La surveillance environnementale de *L. pneumophila* est un élément clé des mesures de contrôle mises en place pour garantir la sécurité et la qualité de l'eau, dans le but de minimiser et de limiter les infections opportunistes chez l'homme (Fields et al., 2002a; Guo et al., 2015).

Comme indiqué dans des travaux antérieurs (Luck et al., 2013; Fontana et al., 2014), plusieurs méthodes de typage moléculaire ont été appliquées aux études de la diversité génétiques et aux enquêtes épidémiologiques moléculaires sur *L. pneumophila*, telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et le typage basé sur la séquence (SBT). Bénéficiant des avantages de la robustesse des données et de la facilité de comparaison inter-laboratoires, le traitement par SBT est maintenant accepté dans le monde entier et largement utilisé pour le génotypage de *L. pneumophila*.

Cette étude rapporte la caractérisation moléculaire de 20 souches de *L. pneumophila* sg1 isolées à partir des eaux chaudes sanitaires des établissements hôteliers du Maroc. Après avoir identifiés les différentes souches par les Mabs, nous avons effectué une analyse moléculaire par typage génotypique faisant appelée à la PFGE et la NGS. L'analyse PFGE et le séquençage total du génome ont été le point de départ pour évaluer la variabilité génétique réelle des souches environnementales et identifier les séquences type des *L. pneumophila* sg1 circulant au Maroc ; identifier celles dominantes et les comparer avec d'autres obtenus dans différentes régions du monde.

Il s'agit de la première étude au Maroc, où des souches environnementales de *L. pneumophila* sg1, isolées dans une vaste zone géographique, ont été identifiées à l'aide d'un typage moléculaire par PFGE et NGS. Les modèles Mabs constituent donc un complément précieux aux méthodes de génotypage pour la définition de sous-groupes au sein d'un groupe génotypique de *L. pneumophila* sg1. Dans notre étude nous avons réalisé un séquençage total du génome. Par la suite, nous avons extrait les séquences correspondantes au locus de la SBT pour attribuer le numéro d'allèle spécifique correspondant au 7 gènes (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* et *neuA*). La technique des anticorps monoclonaux a montré la présence de trois sous-groupes (Table VIII) 6 Campredown, 6 Olda et 7 Oxford, bien évidemment, les souches environnementales sont généralement des MAb 3/1 négatif. Cependant, une étude marocaine publiée en 2013 a révélé la présence de quatre sous-groupes, l'épitope associé à la virulence reconnu par MAb 3/1 était identifié par un total de 60% des isolats (n = 24) (32,5% des France/Allentown et 27,5% des Benidorm). Alors que, 40% des isolats ne sont pas reconnus par Mab 3/1 (27,5% des Olda et 12,5% Bellingham) (Mekkour et al., 2013a).

Selon la base de données ESGLI SBT, 3 ST ont été détectés dans cette étude. Le ST le plus dominant est ST1, qui représente 65% (13/20 souches) de tous les isolats de *L. pneumophila* sg1. Il est le plus largement répandu dans le monde et le plus commun des ST déclaré dans la base de données ESGLI SBT (environ 14%). C'est également le ST le plus fréquemment associé à la maladie des légionnaires



puisqu'elle a été isolé chez des patients de différentes régions (Harrison et al., 2009; Kozak et al., 2009; Reimer et al., 2010; Guo et al., 2015; Gomez-Valero et al., 2009).

Des résultats similaires ont été rapportés dans divers pays. Au Japon, la majorité des souches de *L. pneumophila* isolées des systèmes d'eau sont des ST1 (Amemura-Maekawa et al., 2012). Dans une autre étude réalisée aux Etats-Unis, le ST1 est le sequence type fréquemment retrouvé dans les isolats environnementaux (Kozak-Muiznieks et al., 2014). En Angleterre, 54 sur 154 des souches environnementales de *L. pneumophila* sg1 appartenaient à ST1 (Harrison et al., 2009).

Le ST2897, est un nouveaux ST identifié pour la première fois, par cette étude, constituait 15% (03/20) de tous les isolats. La ST560 représente 20% (04/20) (Tableau XI). De même que les souches de *L. pneumophila* sg1 sont impliquées majoritairement en pathologie humaine, certains ST sont retrouvés plus fréquemment chez les patients. Ainsi, des données internationales de typage regroupant 3600 isolats et 36 pays, ont montré que 46% des cas étaient associés à 6 ST uniquement : ST1, ST23, ST37, ST42, ST47 et ST62 (Guo et al., 2015; Fontana et al., 2014; Sanchez-Buso et al., 2015).

Sur le plan électrophorétique, les souches obtenues ont été représentées par 3 profils génomiques distincts selon les critères de Tenover et al. (1995). Le profil C1 présente des pulsotypes similaires au profil de la souche endémique Paris. Le clone de *L. pneumophila* Paris est distribué mondialement et responsable des épidémies à travers le monde (Cazalet et al., 2008; Reimer et al., 2010; Tijet et al., 2010) avec 10% environ des épidémies en France (Aurell et al., 2003). En outre, notre étude a révélé aussi la présence d'un autre profil (C2) enregistré chez quatre souches, deux isolées à Tanger en 2016 et les deux autres isolées à Casablanca en 2018. Un dernier profil C3 est retrouvé seulement à Casablanca enregistré chez 3 souches isolées en 2018 et appartenaient au sous-groupe Camperdown. Cela pourrait s'expliquer par une contamination du réseau de distribution publique. Un résultat similaire a été rapporté à Paris et en Tunisie, où des souches de *L. pneumophila* isolées dans la même zone géographique ont le même profil à la PFGE, ce qui mettrait en cause, soit la dissémination d'un clone à travers le réseau de distribution, soit la contamination de la source (Lawrence et al., 1999; Mehiri-Zghal et al., 2008). Le C1 et C2 est retrouvé dans des hôtels éloignés les uns des autres, ce qui exclurait une source ou un système de distribution d'eau commun. Ces résultats sont accord avec une étude antérieure, qui a identifiés des souches environnementales à des endroits éloignés de plus de 750km (Luck et al., 1994). Il serait donc possible que la souche soit disséminée à différents endroits du royaume.

Le fait de retrouver des pulsotypes identiques pour des souches isolées à des endroits différents rejoint l'observation faite par plusieurs auteurs, selon laquelle, il existe une distribution clonale de *L. pneumophila* dans le monde et certains clones des isolats environnementaux de *L. pneumophila* sg1 colonisent différentes régions (Cazalet et al., 2008; Selander et al., 1985).

Dans notre étude, des ST identiques ont été trouvé parmi des souches ayant différents sous-groupes, ce qui est en accord avec des études antérieures (Chasqueira et al., 2009; Harrison et al., 2009; Reimer et al., 2010). Généralement, les profils identiques issus d'une macro-restriction par Electrophorèse en

Champ Pulsé correspondent à des caractéristiques génétiques appartenant aux mêmes sous-groupes. Par conséquent, il est très utile d'ajouter des méthodes de génotypage au typage MAb lors de la définition de profils au sein d'un sous-groupe phénotypique (Gaia et al., 2003; Chasqueira et al., 2009).

## V. Conclusion

Nos résultats ont montré l'existence de divers sous-groupes de *L. pneumophila* séro groupe 1 circulant au Maroc. Trois séquence type ont été identifiées, dont une est identifiée pour la première fois. L'étude a contribué à l'enrichissement de la base de données EWGLI-SBT par l'identification d'une nouvelle ST et à la connaissance de la diversité génétique de *L. pneumophila* au niveau du Maroc. Cette étude représente la première base de données sur des souches environnementales de *L. pneumophila* sg1 circulant au Maroc, fournissant des données moléculaires et épidémiologiques intéressantes et utiles pour les futures enquêtes épidémiologiques, en particulier les cas de légionellose associée aux voyages.



### ✓ Caractérisation moléculaire de 20 souches de *L. pneumophila* sg 1

- Trois méthodes ont été utilisées pour le typage moléculaire à savoir la technique d'anticorps monoclonaux (Mabs), l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et le séquençage total du génome (NGS).
  - ✓ Mabs : prévalence de Mab 3/1, avec 8 Camperdown, 7 Oxford et 7 OLDA.
  - ✓ PFGE : 3 profils différents (C1, C2 et C3) ont été obtenus, dont certains sont présents au niveau de plusieurs établissements dans différentes villes du royaume.
  - ✓ NGS : 3 Sequence type (STs) ont été révélées avec une grande prévalence de ST1 suivi par ST560 et un nouveau ST identifié pour la première fois auquel l'ESGLI a attribué le numéro de séquence (ST2897).

## Chapitre IV. Caractérisation physicochimique de la surface bactérienne et de substrat

### I. Introduction

L'adhésion bactérienne à une surface inerte résulte d'un ensemble d'interactions physico-chimiques complexes entre la cellule, la surface et la phase liquide. Ces interactions sont régies par les caractères physicochimique de surface des bactéries et de substrat, tels que la charge électrostatiques, l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons (Briandet et al., 1999).

L'expression de ces interactions physicochimiques dépend des propriétés physicochimiques de la surface cellulaire bactérienne, qui dépend des conditions expérimentales de culture (Briandet et al., 1999; Gallardo-Moreno et al., 2002), mais aussi des méthodes utilisées pour les déterminer. Pour cette raison, il est difficile de discuter spécifiquement une valeur d'hydrophobicité absolue ; par conséquent, une bonne estimation des propriétés des cellules hydrophobes devrait prendre en compte différentes méthodes (Djeribi et al., 2013).

L'hydrophobicité peut être déterminée par plusieurs méthodes comme l'angle de contact, l'adhésion microbienne aux solvants (MATS), l'adhésion microbienne aux hydrocarbures (MATH), l'agrégation par les sels, partage entre phases aqueuses non miscibles polyéthylène glycol et dextran (PEG/DEX), chromatographie d'interactions hydrophobes...etc. Par contre, le caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons peut être déterminé seulement par deux méthodes à savoir l'angle de contact et l'adhésion microbienne aux solvants.

Par ailleurs, la méthode de l'angle de contact reste la plus utilisée, comme étant une méthode simple, rapide et qui nous permet la détermination des deux propriétés.

Dans un tel contexte, le but de ce travail est d'estimer les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire de *L. pneumophila* et des matériaux de la plomberie les plus couramment utilisés pour la distribution d'eaux au Maroc. Il s'agit de déterminer l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons pour l'évaluation et le contrôle de l'adhésion et la formation de biofilm. La rugosité de la surface des matériaux a été également investiguée par la Microscopie à Force Atomique (AFM).

### II. Matériel et méthodes

#### II.1. Caractérisation physico-chimique de la surface bactérienne

##### II.1.1. Souches et conditions de culture

L'étude est portée sur 40 souches bactériennes parmi celles isolées durant notre campagne de prélèvement au niveau des établissements hôteliers. Les souches de *L. pneumophila* sont cultivées sur milieu solide sélectif des Légionelles Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide (GVPC) (Bio-Mérieux, France) à  $37^{\circ}\text{C} \pm 2.5\%$   $\text{CO}_2$  pendant 3 jours.

### II.1.2. Préparation de la suspension bactérienne

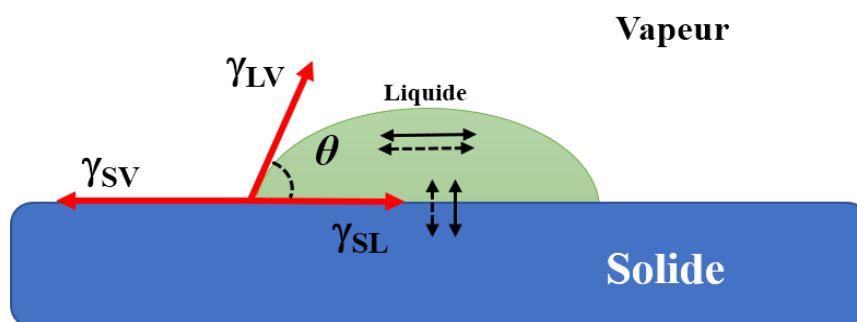
Après le temps d'incubation, les cellules sont raclées du milieu solide et mises dans une solution de  $\text{KNO}_3$  (0.1M), puis lavées par une succession de deux centrifugations (15 min, à 8400g) pour éliminer les résidus du milieu de culture puis remises en suspension dans la solution de  $\text{KNO}_3$  (0.1 M). Par la suite, 10ml de la suspension des cellules sont déposés sur un filtre d'acétate de cellulose de  $0.45\mu\text{m}$  (Sartorius, France) mouillé préalablement par 10 ml d'eau distillée. Les cellules lavées sont filtrées par l'utilisation de la rampe filtrante au moyen de pompage à vide (Sartorius, France) jusqu'à l'obtention d'une couche mince de cellules bactériennes. Les filtres humides sont placés soigneusement sur un support de verre et laissés sécher à température ambiante pendant 30 min.

## II.2. Caractérisation physico-chimique du verre et des matériaux de la plomberie

Le verre et les matériaux de la plomberie qui sont couramment utilisés pour la distribution des eaux chaudes sanitaires au Maroc ont été sélectionnés pour cette étude en se basant sur les résultats du questionnaire établis et complété par les établissements hôteliers. 6 types de matériaux ont été caractérisés : le Polypropylène random copolymère (PPR), l'acier galvanisé, le Polychlorure de vinyle (PVC), le Polyéthylène réticulé (PEX-c), l'acier inoxydable et le cuivre. Les matériaux ont été coupés en sections de  $1\text{cm}^2$  et nettoyés par l'acétone pour éliminer toute saleté ou huile et trempés par la suite pendant 15 minutes dans une solution d'éthanol à 70% (Vol / Vol), puis ont été rincés avec de l'eau distillée et autoclavés à  $120^\circ\text{C}$  pendant 15 min et caractérisés par l'angle de contact.

### II.3. Principe de l'angle de contact et méthode de mesure

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact ( $\theta$ ). La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface et dépend des interactions entre le liquide et le solide. Posons une goutte sur un solide plan et lisse. En absence de tout phénomène d'hystérésis, elle adopte un angle de contact d'équilibre avec le solide (Figure 27).



**Figure 27.** Angle de contact comme balance de force. Les énergies apolaires sont indiquées par des flèches pleines horizontales et verticales ; les énergies polaires (Acide-base de Lewis) sont désignées par des flèches à tirets horizontales et verticales.

Considérons une goutte liquide (L) posée sur un solide (s) :

- Si l'eau est utilisée comme liquide, on peut déterminer le caractère hydrophobe (faible énergie de surface) ou hydrophile (grande énergie de surface) de la surface de l'échantillon.
- Si l'on utilise d'autres liquides comme le formamide et le diiodométhane, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Van Oss (van Oss 1988).

$$\cos\theta = -1 + 2(\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW})^{1/2} / \gamma_L + 2(\gamma_S^+ \gamma_L^-)^{1/2} / \gamma_L + 2(\gamma_S^- \gamma_L^+)^{1/2} / \gamma_L$$

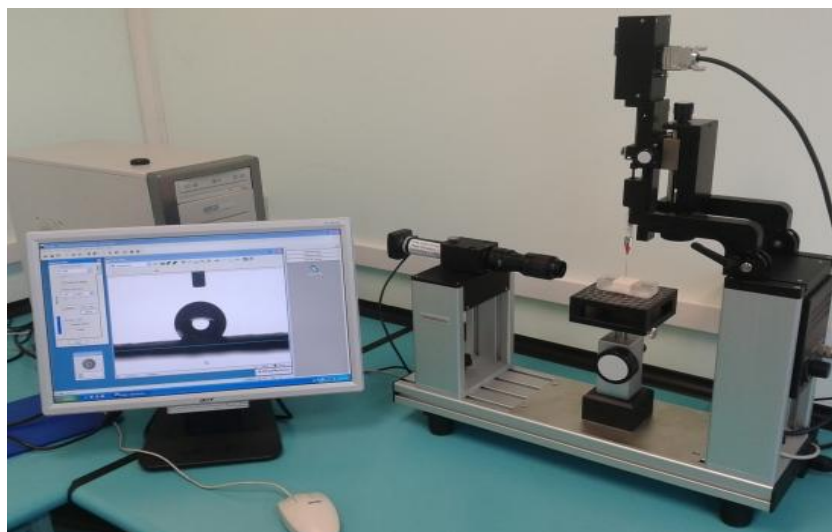
$\gamma_S^{LW}$  : Composantes de Lifshitz- Van der Waals de la surface ;  $\gamma_L^{LW}$  : Composantes de Lifshitz- Van der Waals du liquide ;  $\gamma_S^+$  : Composante(s) accepteurs d'électrons de la surface ;  $\gamma_L^+$  : Composante(s) accepteurs d'électrons du liquide ;  $\gamma_S^-$  : Composant e(s) donneurs d'électrons de la surface ;  $\gamma_L^-$  : Composant e(s) donneurs d'électrons du liquide.

Une goutte du liquide est disposée sur la surface. Trois à six mesures d'angle de contact sont réalisées sur chaque échantillon en utilisant les trois solvants : eau distillée, formamide et diiodométhane (Tableau IX).

**Tableau IX.** Composantes Van der Waals, accepteur d'électrons et donneur d'électrons de l'énergie libre des trois liquides utilisés dans la méthode des angles de contacts

Liquide	$\gamma^{LW}$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	$\gamma^+$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	$\gamma^-$ (mJ.m <sup>-2</sup> )
Eau (H <sub>2</sub> O)	21.6	25.4	25.4
Formamide (CHONH <sub>2</sub> )	38.7	2.3	39.4
Diiodométhane (CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub> )	50.5	0.7	0.0

Les caractéristiques physico-chimiques de la surface des micro-organismes et celles du verre et des matériaux de la plomberie sont obtenues à partir de mesures d'angles de contact à l'aide d'un goniomètre (GBX, France) (Figure 28).



**Figure 28.** Appareil d'angle de contact

L'hydrophobicité peut être mesurée par une méthode qualitative (angle de contact vis-à-vis de l'eau,  $\theta_w$ ) ou par une méthode quantitative (Energie libre d'interaction,  $\Delta G_{iwi}$ ). D'après Vogler (1998), la surface est considérée hydrophobe si  $\theta_w$  est supérieur à  $65^\circ$  et hydrophile si  $\theta_w$  est inférieur à  $65^\circ$ . En se basant sur l'approche de Van Oss et al. (1988); Van Oss (1995), il est possible de déterminer le degré d'hydrophobicité d'une substance vis-à-vis de l'eau.

Dans cette approche, le degré d'hydrophobicité d'un matériau donné est exprimé comme l'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{iwi}$ ) entre deux entités de ce matériau lorsqu'elles sont immergées dans l'eau (w). Elle est exprimée en unité internationale ( $\text{mJ/m}^2$ ). Si l'énergie libre de surface est négative ( $\Delta G_{iwi} < 0$ ), les matériaux sont considérés comme hydrophobes, inversement, les matériaux sont hydrophiles si  $\Delta G_{iwi} > 0$ . L'énergie libre d'interaction peut être évaluée à travers les composants de tension superficielle des entités interagissant, selon l'équation suivante :

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} = -2 \left[ \left( (\gamma_i^{LW})^{\frac{1}{2}} - (\gamma_w^{LW})^{\frac{1}{2}} \right)^2 + 2(\gamma_i^+ \gamma_i^-)^{\frac{1}{2}} + (\gamma_w^+ \gamma_w^-)^{\frac{1}{2}} - (\gamma_i^+ \gamma_w^-)^{1/2} - (\gamma_w^+ \gamma_i^-)^{1/2} \right]$$

$\gamma_i^{LW}$  : Composantes de Lifshitz- Van der Waals de la surface ;  $\gamma_w^{LW}$  : Composantes de Lifshitz- Van der Waals de l'eau;  $\gamma_i^+$  : Composante(s) accepteurs d'électrons de la surface;  $\gamma_w^+$  : Composante(s) accepteurs d'électrons de l'eau;  $\gamma_i^-$  : Composant e(s) donneurs d'électrons de la surface;  $\gamma_w^-$  : Composant e(s) donneurs d'électrons de l'eau.

Les composants Lifshitz-Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) de la tension superficielle des bactéries et des matériaux de plomberie ont été estimées à partir de l'approche proposée par Van Oss et al. (1988).

La composante acide/base de la tension de surface est définie par :

$$\gamma_S^{AB} = 2(\gamma_S^- \gamma_S^+)^{1/2}$$

#### ***II.4. Calcul de l'énergie libre d'interaction totale : Adhésion prédictive***

L'énergie d'interaction ( $\Delta G_{BLS}^{TOT}$ ) entre une bactérie (B) et un support (S) dans un liquide (L) est considérée comme la somme de la composante de Van der Waals ( $\Delta G_{BLS}^{LW}$ ), de la composante acide-base ( $\Delta G_{BLS}^{AB}$ ) et la composante électrique ( $\Delta G_{BLS}^{EL}$ ).

$$\Delta G_{BLS}^{TOT} = \Delta G_{BLS}^{EL} + \Delta G_{BLS}^{LW} + \Delta G_{BLS}^{AB}$$

$$\Delta G_{LW} = ((\gamma_B^{LW})^{1/2} - (\gamma_S^{LW})^{1/2})^2 - ((\gamma_B^{LW})^{1/2} - (\gamma_L^{LW})^{1/2})^2 - ((\gamma_S^{LW})^{1/2} - (\gamma_L^{LW})^{1/2})^2$$

$$\Delta G_{AB} = 2[(\gamma_L^+)^{1/2} [(\gamma_B^-)^{1/2} - (\gamma_L^-)^{1/2}] + (\gamma_L^-)^{1/2} [(\gamma_B^+)^{1/2} + (\gamma_S^+)^{1/2} - (\gamma_L^+)^{1/2}] - (\gamma_L^- \gamma_L^+)^{1/2} - (\gamma_L^+ \gamma_S^-)^{1/2}]$$

### II.5. Microscopie à Force Atomique

Les mesures de la topographie et de la rugosité de surface des matériaux de plomberie ont été réalisées par la Microscopie à Force Atomique (Nanosurf, France) (Figure 29). La valeur Ra est définie comme l'écart moyen ou la moyenne arithmétique des distances entre des pics et des creux successifs (Ecart moyen du profil) qui donne une description de la rugosité de surface (Verran et al., 1991). Nous avons utilisé le « tapping mode in air » pour la mesure et la numérisation de la topographie de surface. Chaque test de balayage a été effectué en trois exemplaires à différentes zones de la surface.



**Figure 29.** Mesure de la topographie de surface des matériaux de la plomberie par la Microscopie à Force Atomique

## III. Résultats

### III.1. Caractérisation physico-chimique de la surface bactérienne des souches

Les résultats des propriétés physicochimiques de la surface bactérienne des souches étudiées sont résumés dans l'annexes 3. Sur les souches de *L. pneumophila* caractérisées par l'angle de contact, 13 ont un caractère hydrophile dont 3 *L. pneumophila sg1* et 10 *L. pneumophila sg2-15*. Tandis que 27 souches de *L. pneumophila* présentent un caractère hydrophobe dont 7 *L. pneumophila sg1* et 20 *L. pneumophila sg2-15*. 10 souches présentent un caractère donneur d'électrons élevé et un caractère accepteur d'électrons faible. Cependant les 20 autres ont un caractère donneur d'électrons faible et un caractère accepteur d'électrons élevé.

### II.2. Caractérisation physico-chimique du verre et des matériaux de plomberie

Les résultats de mesure de l'angle de contact des matériaux, leur énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{\text{wi}}$ ), leur caractère donneur/accepteur d'électrons et la rugosité de surface sont résumés dans le Tableau X :

**Tableau X.** Angle de contact par rapport aux différents solvants, énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{\text{wi}}$ ) et le caractère donneur/accepteur d'électron des matériaux :

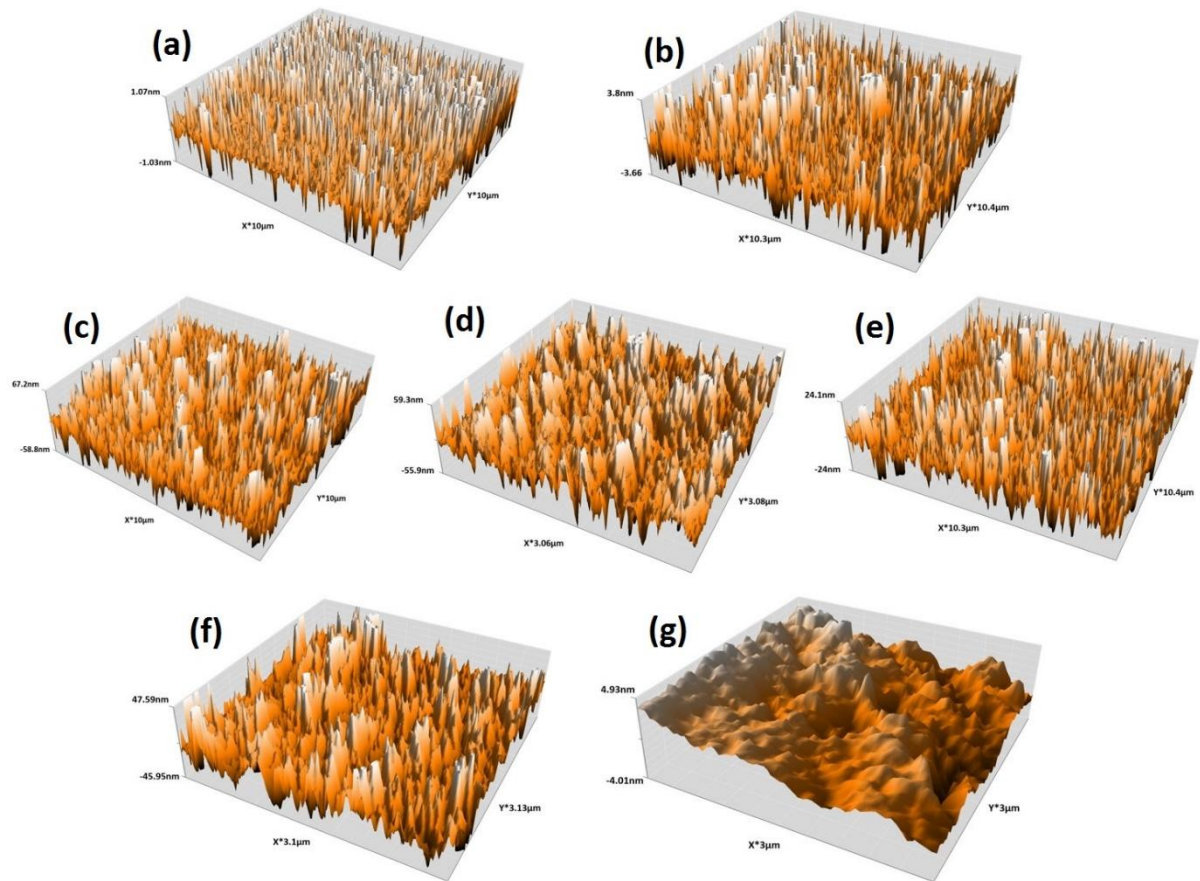
Substrat	Angle de contact (°)			Composantes de l'énergie libre de surface (mJ/m <sup>2</sup> )				Rugosité $R_a$ (nm)
	Eau	Formamide	Diidomethane	$\gamma^{\text{LW}}$	$\gamma^-$	$\gamma^+$	$\Delta G_{\text{wi}}$	
Acier galvanisé	103.7 (2.1)	114.6 (2.6)	92.2 (2.1)	11.72	16.09	2.73	-17.22	26
PVC	81.9 (1.2)	73.6 (2.3)	92.5 (2.1)	11.59	11.31	3.03	-25.50	23
Cuivre	84.8 (1.1)	79.5 (1.3)	69.2 (1.4)	23.28	13.18	0.09	- 27.01	21
PEX-c	79.1 (3.2)	58.0 (2.0)	42.3 (1.4)	38.40	6.96	0.06	-51.10	16
PPR	103 (1.7)	80.0 (2.0)	64.0 (2.0)	26.22	0.35	0.04	-86.75	15
Acier inoxydable	84.1 (3.2)	67.4 (1.9)	39.6 (1.3)	39.72	7.01	0.23	-49.23	3
Verre	32 (1.6)	20.1 (1.2)	41.3 (1.3)	38.86	1.58	40.31	14.80	0.4

$\gamma^{\text{LW}}$ : The Lifshitz-Van der Waals components of the surface tension.  $\gamma^-$ : electron donor components of the surface tension.  $\gamma^+$ : electron acceptor components of the surface tension.  $\gamma^{\text{AB}}$ : the Lewis acid-base surface tension component.  $\Delta G_{\text{wi}}$ : the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water.

D'après les résultats obtenus, la surfaces des matériaux de la plomberie testés présentent un caractère quantitativement ( $\theta_w > 65^\circ$ ) et qualitativement ( $\Delta G_{\text{wi}} < 0$ ) hydrophobe, avec une hydrophobicité bien marquée pour l'acier galvanisé et le PPR. A l'exception du PPR, les autres matériaux de plomberie ont un caractère donneur d'électrons élevé ( $\gamma^- = 16,09$ ). Tandis que le caractère accepteur d'électrons reste faible pour tous les matériaux ( $\gamma^+ = 0,04$ ). Contrairement aux matériaux de plomberie, la surface du verre a été classée hydrophile et présente un caractère relativement donneur d'électrons élevé et un caractère accepteur d'électrons plus faible. En termes de rugosité, l'acier galvanisé, le cuivre et le PVC sont les matériaux les plus rugueux suivis par le PEX-c, le PPR et l'acier inoxydable. Les surfaces de verre présentent une faible rugosité.

La Figure 30 illustre les images tridimensionnelles du verre et des matériaux de la plomberie observés par la Microscopie à Force Atomique.





**Figure 30.** Les images tridimensionnelles du verre (a) et des matériaux de plomberie réalisés par la Microscopie à Force Atomique y compris l'acier inoxydable (b), l'acier galvanisé (c), le PVC (d), le PPR (e), le PEX-c (f) et le cuivre (g).

### II.3. Calcul de l'énergie libre d'interaction totale : Adhésion prédictive

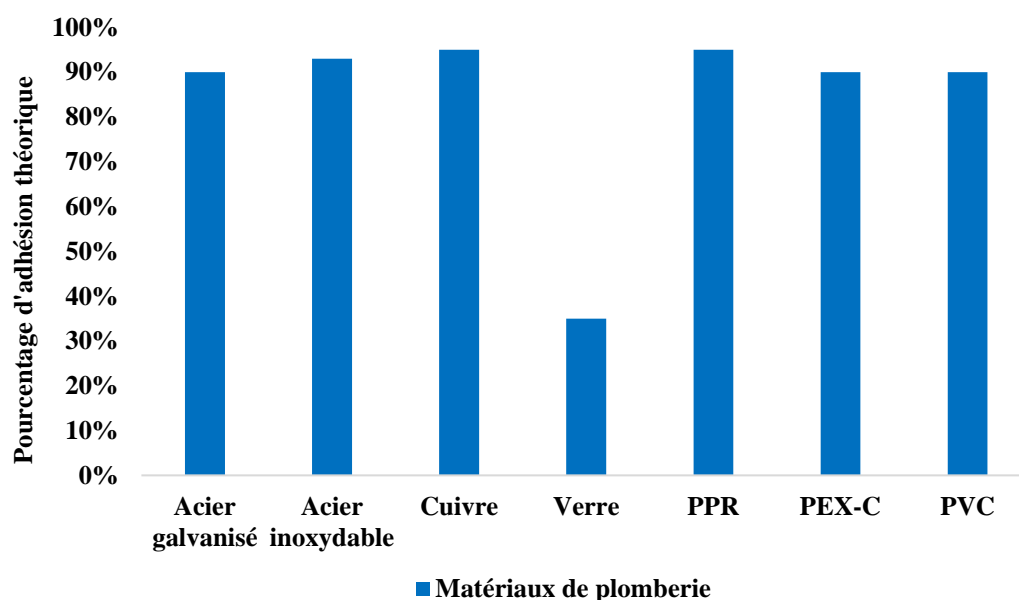
En utilisant l'approche de DLVO développée par van Oss, l'énergie totale (non électrostatique) de l'adhésion de 40 souches de *L. pneumophila* sur les différents matériaux de la plomberie étudiés testés ainsi que ses composantes acide-base (AB) et Lifshitz -van der Waals (LW) a été calculée par les équations issues du modèle de van Oss (van Oss, 1994; Soumya et al., 2013; Bayoudh et al., 2006). Les résultats obtenus sont résumés dans l'annexe 4.

Le phénomène de l'adhésion des micro-organismes aux surfaces peut être appréhendé sous un angle thermodynamique (Busscher et al., 1984). D'après l'approche thermodynamique étendue (DVLO étendue) dans laquelle les interactions physicochimiques sont considérées, l'adhésion d'un microorganisme n'est énergétiquement favorisée que lorsque  $\Delta G^{\text{TOT}}$  est négative.

De ce fait, d'après les résultats obtenus, il est à noter que la variabilité de l'énergie totale de l'adhésion entre les différents matériaux dépend essentiellement à la fois des bactéries et du type de matériaux utilisé (Figure 31).

Sachant que la phase initiale de l'adhésion est gouvernée par les interactions de Van der Waals, la valeur négative de la composante LW indique que l'adhésion est favorable sur la surface des matériaux de la plomberie. La deuxième phase de l'adhésion est engendrée par les interactions acido-basiques lorsque les liaisons hydrogènes et les interactions chimiques sont intervenues. La valeur positive de la composante AB implique que l'adhésion est défavorable ou faible sur la surface des matériaux et vice versa.

Par l'utilisation de l'approche théorique et en tenant compte des différents sérogroupes de *L. pneumophila* et le type du matériau de la plomberie, l'analyse complète des données obtenues a montré que la variabilité de l'énergie totale de l'adhésion entre les différents matériaux de la plomberie est essentiellement due à la composante AB.



**Figure 31.** Pourcentage d'adhésion théorique des 40 souches de *L. pneumophila* aux différents matériaux de la plomberie.

#### IV. Discussion

La nature de la surface bactérienne détermine les interactions microorganisme-support (Reifsteck et al., 1987; Bellon-Fontaine et al., 1996). Ainsi, les interactions physicochimiques entre une surface bactérienne et un support résultent d'une combinaison de forces de Van der Waals, de forces électrostatiques, de propriétés acide-base de Lewis et de liaisons hydrophobes (Briandet et al., 1999; Bellon-Fontaine et al., 1996; Krepsky et al., 2003).

Les caractéristiques physicochimiques de la surface bactérienne jouent un rôle déterminant dans l'adhésion bactérienne aux surfaces inertes. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est la

caractérisation physicochimique de la surface bactérienne ainsi que celle du substrat. Pour cela, la méthode d'angle de contact a été choisie pour la réalisation des mesures vu les avantages qu'elle présente en termes rapidité, simplicité et fiabilité. Les paramètres déterminés sont l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons. A la lumière des résultats obtenus, 13 souches bactériennes ont un caractère hydrophile et 27 ont une surface hydrophobe. Concernant les matériaux caractérisés, la surface du verre est hydrophile, elle présente un caractère relativement donneur d'électrons qu'accepteur d'électrons. Ces résultats est en accord avec les travaux de Hamadi et al. (2009) qui ont montré que le verre est hydrophile et fortement donneur d'électrons. A l'inverse, les matériaux de plomberie testés présentent un caractère hydrophobe ( $\theta_w > 65^\circ$ ,  $\Delta G_{\text{wi}} < 0$ ), avec une hydrophobicité bien marquée pour l'acier galvanisé et le PPR. Ces résultats sont en accord également avec des travaux qui ont montré que le PPR, le PVC et le PEX-c sont hydrophobes (Boutaleb et al., 2008; Teixeira and Oliveira, 1999). L'acier inoxydable a été aussi classifié hydrophobe par plusieurs auteurs (Chamberlain and Johal, 1988; Hamadi et al., 2014; Teixeira et al., 2008). De même, l'acier galvanisé, l'acier inoxydable, le cuivre, le PVC et le PEX-c ont un caractère donneur d'électrons élevé (valeur élevée de  $\gamma^-$ ) et faiblement accepteur d'électrons (faible valeur de  $\gamma^+$ ). Hamadi et al. (2014) ont trouvé que l'acier inoxydable présente un caractère donneur/accepteur d'électrons relativement élevé. La surface du PPR présente un caractère faiblement donneur/accepteur d'électrons. D'après Silva et al. (2008) et contrairement à nos résultats, le PPR est faiblement donneur/accepteur d'électrons.

Plusieurs auteurs ont montré que l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact est directement corrélée avec le rapport élevé des concentrations de N/C et inversement corrélée avec celui des concentrations de O/C (Mozes et al., 1989; Mozes et al., 1988; Latrache et al., 1994; Cowan et al., 1992; Cuperus et al., 1993; van der Mei et al., 1997; Dengis and Rouxhet, 1997; Dufrêne et al., 1997; Boonaert and Rouxhet, 2000; Latrache et al., 2002). Ces résultats indiquent que l'origine du caractère hydrophobe mesuré par l'angle de contact est les groupements contenant l'azote, alors que l'origine du caractère hydrophile est les groupements contenant l'oxygène. Dufrêne et al. (1997) ont montré que le caractère hydrophile des bactéries est lié à la présence de polysaccharides et le caractère hydrophobe est liée à la présence des hydrocarbures. Latrache et al. (2002) ont montré également que le caractère hydrophile d'*E. coli* est liée à la présence des polysaccharides, alors que le caractère hydrophobe est lié à la présence des protéines.

Comme pour l'hydrophobicité de la surface des micro-organismes, plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude des éléments chimiques qui sont à l'origine du caractère donneur/accepteur d'électrons. En effet, plusieurs travaux ont rapporté que la charge de la surface cellulaire peut être expliquée sur la base de la composition chimique déterminée par spectrophotométrie aux rayons X (XPS) (Magnusson et al., 1977; Amory et al., 1988a; Mozes et al., 1989; Cowan et al., 1992; Cuperus et al., 1993; Van der Mei et al., 1993; Latrache et al., 1994; Rouxhet et al., 1994; ElGhmari et al., 2002). Plusieurs études ont étudié également la relation entre la charge de la surface bactérienne et sa composition chimique (Mozes et al.,

1989; Amory et al., 1988b; Van der Mei et al., 1989; Cowan et al., 1992; Cuperus et al., 1993; Van der Mei et al., 1993; Latrache et al., 1994). En effet, l'importance du caractère donneur d'électrons a été attribuée à la présence de groupements basiques exposés à la surface cellulaire, comme les groupements carboxyles ( $\text{COO}^-$ ) et phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), des phospholipides, lipoprotéines et lipopolysaccharides, amines ( $\text{NH}$ ) (Briandet et al., 1999) ou les groupements sulfates ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) (Pelletier et al., 1997). Aussi, l'importance du caractère accepteur d'électrons a été attribuée à la présence des groupements acides exposés à la surface cellulaire, comme  $\text{R-NH}$  ou  $\text{R-OH}$ . Les travaux de Hamadi et al. (2012) ont corrélée le caractère donneur d'électrons de la surface d'*E. coli* à une combinaison des groupe carboxyle et amine et aussi à une combinaison des protéines et des polysaccharides.

L'adhésion bactérienne est un processus complexe influencé par de nombreux facteurs tels que les conditions environnementales, les propriétés bactériennes et les caractéristiques de surfaces à coloniser. Pour bien comprendre les mécanismes impliqués dans l'adhésion bactérienne sous différentes conditions, le Chapitre V sera consacré à l'étude de l'adhésion de *L. pneumophila* au verre et aux matériaux de plomberie.



#### ✓ Caractérisation physicochimique de la surface bactérienne et de substrat

- Sur 40 souches étudiées, 13 ont montré un caractère hydrophile et 27 présentent un caractère hydrophobe. 3 souches de *L. pneumophila* sg1 ont un caractère hydrophile et 10 hydrophobes.
- La surface des matériaux de la plomberie testés présente un caractère hydrophobe, avec une hydrophobicité bien marquée pour l'acier galvanisé et le PPR.
- La surface du verre est hydrophile.
- A l'exception du PPR, les autres matériaux de plomberie ont un caractère donneur d'électrons élevé.
- Tous les matériaux ont un caractère faiblement accepteur d'électrons.
- L'acier galvanisé est le matériau le plus rugueux, suivi par le cuivre, le PVC, le PEX-c, le PPR et l'acier inoxydable.

## Chapitre V. Adhésion de *L. pneumophila* au verre et aux matériaux de la plomberie

### I. Introduction

Dans l'environnement, *L. pneumophila* se retrouve principalement dans les systèmes d'eau naturels et artificiels. Elle est fréquemment détectée dans les systèmes de la plomberie de différentes institutions, comme les hôpitaux, les hôtels et les centres de santé (Oder et al., 2015; Tesauro et al., 2010). Cette bactérie a la capacité d'adhérer à diverses surfaces et de survivre dans les biofilms et les amibes libres (Borella et al., 2005a; Temmerman et al., 2006b; Taylor et al., 2009b). Il est estimé que 95% de la biomasse dans les systèmes d'eau est située à la surface interne des canalisations en tant que biofilm, alors que seulement 5% se trouvent à l'état planctonique (Flemming et al., 2002). Un des nombreux avantages des biofilms pour *Legionella* est sa protection contre les conditions environnementales stressantes et la résistance au biocides (Borella P et al., 2005). Pour survive, les bactéries adhèrent à la surface en formant des communautés microbiennes appelées biofilms. En effet, l'adhésion bactérienne aux surfaces est l'un des premiers stades de développement bactérien et par la suite la formation de biofilms. Une fois formés, les biofilms sont difficiles à éradiquer, par conséquent, la prévention de l'attachement bactérien est une approche alternative pour leur contrôle. Plusieurs études ont rapporté que l'adhésion bactérienne est un processus complexe influencé par de nombreux facteurs tels que les conditions environnementales, les propriétés physicochimiques de la surface bactérienne et les surfaces à coloniser (hydrophobicité, caractère donneur/accepteur d'électrons), mais aussi les interactions physicochimiques entre le support et la bactérie qui incluent les interactions électrostatiques, Van der Waals et Lewis acide/base (Bellon-Fontaine et al., 1996; Briandet et al., 1999; Pagedar et al., 2010; Krepsky et al., 2003). Dans ce contexte, les mécanismes impliqués dans l'adhésion bactérienne sous différentes conditions doivent être établis. En outre, les propriétés physiques des matériaux (rugosité, nature du matériaux...), le milieu de culture et les conditions environnementales (pH, Température, charge ionique) jouent également un rôle essentiel dans le process d'adhésion bactérienne (Donlan, 2002; Bengourram et al., 2009; Oder et al., 2015).

Les études de l'adhésion de l'espèce *L. pneumophila* aux surfaces n'ont pas pris une grande importance dans la littérature (Oder et al., 2015; Pecastaings et al., 2010). En effet, l'objectif de ce travail consiste en premier lieu à étudier l'adhésion de *L. pneumophila* séro groupe 1 et *L. pneumophila* séro groupe 2-15 à la surface des matériaux de la plomberie, y compris l'acier galvanisé, l'acier inoxydable, le cuivre, le Polychlorure de vinyle (PVC), le Polypropylène random copolymère (PPR) et le Polyéthylène réticulé (PEX-c), et en second lieu à investiguer l'effet des propriétés physicochimiques de la surface et la rugosité sur l'adhésion de ces bactéries.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Souches bactériennes, conditions de culture et préparation de la suspension bactérienne

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 isolées à partir des systèmes d'eau chaude des établissements hôteliers (prises de notre stock relatif aux prélèvements réalisés durant l'enquête environnementale). En se basant sur un test de formation de biofilm préliminaire, déterminant la capacité de formation de biofilm de chaque souche. Le test a révélé que ces deux souches ont la plus grande capacité de former le biofilm. Les souches ont été cultivées sur le milieu sélectif des légionelles Glycine-Vancomycine-Polymyxine-Cycloheximide (GVPC) à  $37^{\circ}\text{C} \pm \text{CO}_2$  (2.5%) pendant 72h. Après incubation, les cellules bactériennes sont récoltées par centrifugation à 8400g pendant 15min. Les cellules sont lavées par une solution de  $\text{KNO}_3$  (0.1M) par une succession de deux centrifugations pour éliminer les résidus du milieu de culture puis remises en suspension dans du  $\text{KNO}_3$  (0.1M) et ajustées à une densité optique de  $10^8$  UFC/ml.

### II.2. Préparation et nettoyage des matériaux

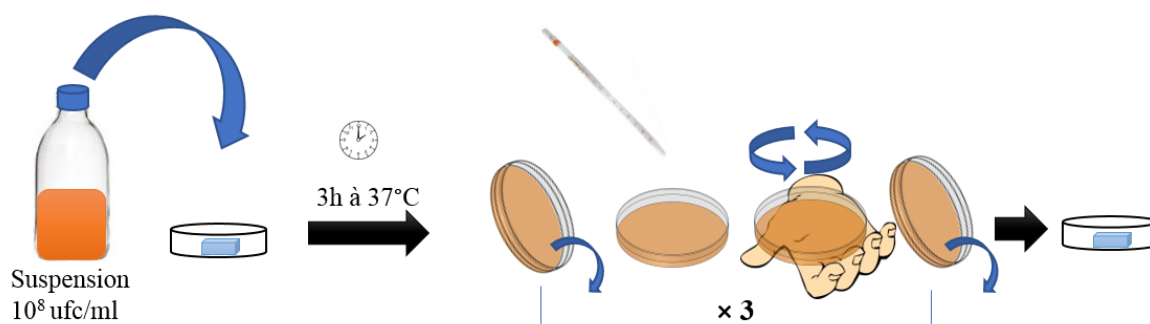
Le verre et les matériaux de plomberie sélectionnés pour cette étude ont été coupés en échantillons de  $1\text{cm}^2$ , nettoyés dans de l'acétone pour éliminer toute saleté ou huile et trempés pendant 15 minutes dans une solution d'éthanol à 70% (Vol / Vol), puis rincés avec de l'eau distillée et autoclavés à  $120^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min.

### II.3. Détermination des propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne et de substrat

Comme nous l'avons précédemment décrit dans le chapitre VI, trois à six mesures d'angle de contact sont réalisées sur chaque échantillon en utilisant les trois solvants : eau distillée, formamide et diiodométhane.

### II.5. Test d'adhésion

Les tests d'adhésion sont réalisés par sédimentation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 3h. Après incubation, les supports ont été rincés trois fois par de l'eau distillée stérile manuellement et délicatement pour éliminer les cellules non adhérentes (Figure 32). Les substrats ont été immergés dans des tubes à essai contenant de l'eau physiologique stérile ( $\text{NaCl}$  : 9g/l). Les cellules bactériennes ont été détachées des substrats en utilisant un bain de sonication pendant 2 min. Les UFC (Unité formant colonies) ont été déterminées en utilisant la technique de dilution en série de la suspension bactérienne obtenue après sonication. Le dénombrement est réalisé sur le milieu sélectif GVPC après incubation pendant 72h à  $37^{\circ}\text{C} \pm \text{CO}_2$  (2,5%). Chaque expérience a été réalisée en trois exemplaires.



**Figure 32.** Schéma du test d'adhésion

### III. Résultats

#### III.1. Caractérisation de la surface bactérienne et du substrat

Les propriétés physico-chimiques de la surface des deux souches sélectionnées pour cette étude, *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15, sont résumés ci-dessous dans le Tableau XI.

**Tableau XI.** Les valeurs de l'angles de contact avec l'écart-type (°), les valeurs d'énergie de surface avec l'écart type (mJ m<sup>-2</sup>) des cellules bactériennes.

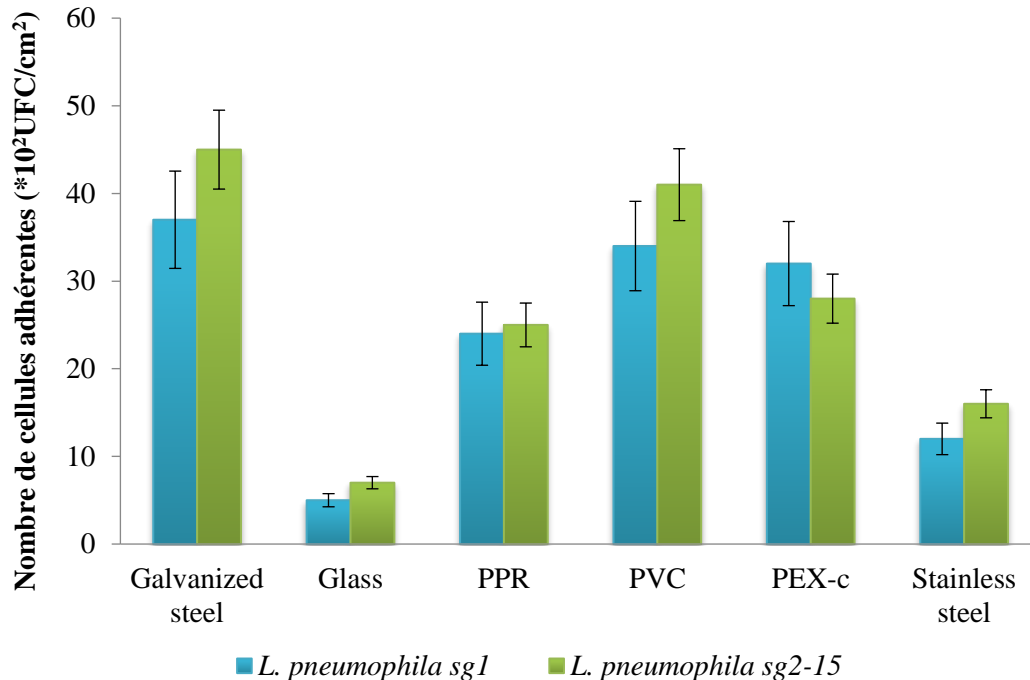
Bactéries	Angle de contact (°)			Composantes de l'énergie libre d'interaction (mJ/m <sup>2</sup> )			
	Eau	Formamide	Diidomethane	$\gamma^{LW}$	$\gamma^-$	$\gamma^+$	$\Delta G_{iWi}$
<i>Lpn</i> sg 2-15	48.9 (1.2)	39.2 (1.6)	112.4 (1.0)	4.85	22.73	26.75	-12.02
<i>Lpn</i> sg 1	45.1 (1.7)	35.7 (2.1)	110.9 (2.2)	5.24	22.99	29.32	-10.94

$\gamma^{LW}$ : The Lifshitz-Van der Waals components of the surface tension.  $\gamma^-$ : electron donor components of the surface tension.  $\gamma^+$ : electron acceptor components of the surface tension.  $\gamma^{LW}$ : the Lewis acid-base surface tension component.  $\Delta G_{iWi}$ : the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water. *Lpn*: *L. pneumophila*

#### III.2. Adhésion des bactéries au verre et aux matériaux de plomberie

Les résultats de l'adhésion de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 sur le verre et les matériaux de plomberie sont présentés dans la Figure 33. Nous avons observé que les deux souches ont la capacité d'adhérer à la majorité des matériaux testés à l'exception du cuivre, sur lequel aucune cellule n'a été détectée. L'acier galvanisé montre le plus grand nombre de cellules adhérentes ( $3,7 \times 10^3$  et  $4,5 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivement pour *L. pneumophila* sg1 et sg2-15), alors que le verre présente le nombre le plus faible ( $5 \times 10^2$  et  $7 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup>, respectivement pour *L. pneumophila* sg1 et sg2-15). L'acier galvanisé est le matériau qui favorise le plus l'adhésion de *L. pneumophila*, suivi par les matériaux en plastique, l'acier inoxydable et le verre (Figure 33). Le PVC est le matériau en plastique le plus

fortement colonisé par rapport aux PEX-c et PPR avec un nombre maximal de  $3,4 \times 10^3$  et  $4,1 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivement, pour *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 (Figure 33).

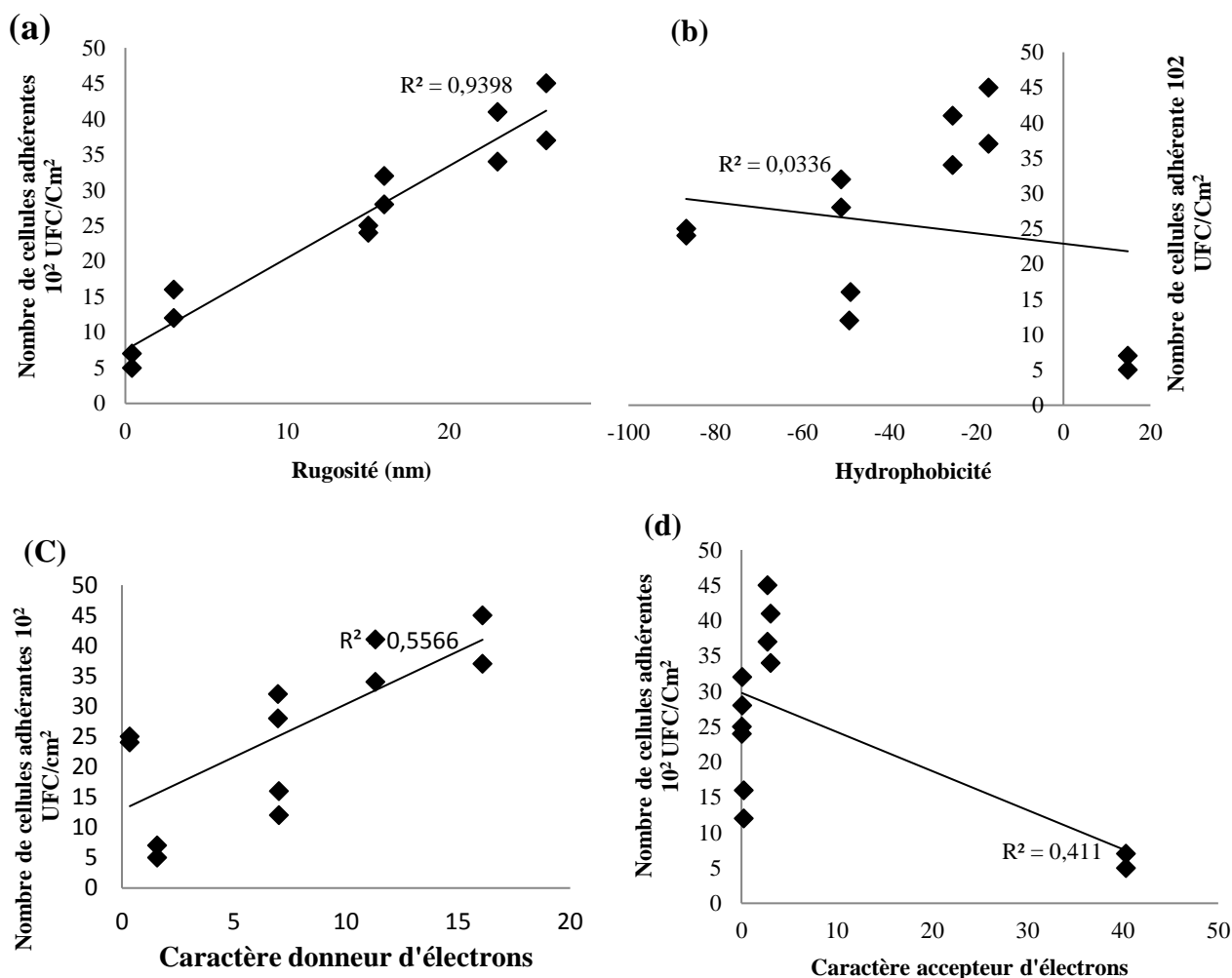


**Figure 33.** Adhésion de *L. pneumophila* sg1 et sg2-15 aux différents matériaux

L'adhésion bactérienne est maximale sur l'acier galvanisé qui présente la plus grande rugosité et un caractère hydrophobe, tandis qu'elle est minimale sur le verre qui a la plus faible rugosité et un caractère hydrophile. En outre, l'adhésion de *L. pneumophila* aux surfaces augmente avec la rugosité de surface (Figure 34). De ce fait, on constate que l'adhésion de *L. pneumophila* est plus importante quand la rugosité augmente, alors qu'elle est relativement faible quand elle diminue. Ce qui suggère que l'adhésion de *L. pneumophila* aux surfaces peut être gouvernée par leur rugosité.

L'intensité de l'adhésion de *L. pneumophila* aux différents matériaux est forte sur l'acier galvanisé suivi par le PVC, le PEX-c, le PPR et l'acier galvanisé. Quant aux deux sérogroupes, la capacité d'adhésion de *L. pneumophila* sg 2-15 aux surfaces des matériaux est plus grande que celle de *L. pneumophila* sg1.





**Figure 34.** Corrélation entre l'adhésion de *L. pneumophila* et la rugosité de surface (a), l'hydrophobicité (b), le caractère donneur d'électron(c) et le caractère d'accepteur d'électron(d)

#### IV. Discussion

L'adhésion bactérienne aux surfaces est régie par plusieurs facteurs. Les plus importants incluent les caractéristiques et la taille des cellules bactériennes, les caractéristiques de la surface des bactéries et de substrat (la charge et l'hydrophobicité), la rugosité des matériaux ainsi que la structure chimique des surfaces (Katsikogianni and Missirlis, 2004). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le processus d'adhésion de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15, différents substrats ont été examinés, en outre, le rôle des propriétés physico-chimiques des cellules bactériennes, du substrat ainsi que de la rugosité des matériaux a été investigué. Il est généralement admis que les propriétés physico-chimiques de la cellule bactérienne et de la surface du substrat sont les principaux facteurs qui favorisent l'adhésion. Les principales interactions impliquées dans la phase initiale d'adhésion sont les forces de Lifshitz Van Der Waals (LW), acide-bases et électrostatiques (Garrett et al., 2008). Dans ce travail, la contribution de la force électrostatique est négligeable car les tests ont été réalisés à une force ionique importante (0.1M) (Gallardo-Moreno et al., 2004).

Pour bien expliquer et comprendre le phénomène d'adhésion de *L. pneumophila* aux surfaces, il est nécessaire de caractériser la surface bactérienne et de substrat, ainsi que de déterminer la rugosité de ces matériaux. Nous avons montré dans le chapitre IV que les deux souches sélectionnées pour cette étude ont un caractère hydrophobe et donneur/accepteur d'électrons (faible ou élevé). De même, et à l'exception du verre qui a un caractère hydrophile, un caractère donneur d'électrons important et un caractère accepteur d'électrons faible, les matériaux de la plomberie ont un caractère hydrophobe, un caractère donneur d'électrons important et un caractère accepteur d'électrons faible. En termes de rugosité, l'acier galvanisé, le cuivre et le PVC sont les matériaux les plus rugueux suivis par le PEX-c, le PPR et l'acier inoxydable. Les surfaces de verre présentent une faible rugosité.

Généralement l'adhésion des cellules bactériennes aux surfaces est gouvernée par les propriétés physicochimiques (Van Loosdrecht et al., 1987), mais cette adhésion est également influencée par les *fimbriae*, les flagelles et la rugosité de la surface du substrat (Oder et al., 2015). Le rôle principal des *fimbriae* et *flagella* est de surmonter la barrière électrostatique entre la cellule et la surface (Corpe, 1980; Zahir et al., 2015); probablement ce mécanisme aide également les cellules de *L. pneumophila* dans le processus d'adhésion, ce qui peut expliquer la forte adhésion au PVC et l'acier galvanisé qu'aux autres matériaux qui sont très hydrophobes. Il est acceptable que les cellules hydrophiles ont tendance à adhérer à un substrat hydrophile, et les cellules hydrophobes ont tendances à s'attacher aux substrats hydrophobes. Cette approche pourrait expliquer la forte et la faible adhésion de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 respectivement à l'acier galvanisé (hydrophobe) et le verre (hydrophile). Les résultats d'adhésion démontrent clairement que l'acier galvanisé, le PVC, le PEX-c et le PPR sont les matériaux les plus colonisés que l'acier inoxydable et le verre (Figure 34). Le cuivre ne favorise pas la colonisation et l'adhésion de *L. pneumophila*. Plusieurs études ont montrés que le cuivre a un effet bactéricide dû aux ions de cuivre (Hu et al., 2005), ce qui conduit à un nombre de cellules adhérentes à la surface du cuivre nulle. Cependant, d'autres études ont rapporté que *Legionella* peut former des biofilms purs sur le cuivre et survivre pendant des semaines (Giao et al., 2015).

Dans cette étude, nous avons analysé la corrélation entre l'adhésion bactérienne et différents paramètres tels que la rugosité et les propriétés physico-chimiques (hydrophobicité et donneur/accepteur d'électrons). Une bonne corrélation a été observée entre la rugosité de surface du substrat et l'adhésion bactérienne de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg-15 ( $R^2 = 0,9398$ ) ; Le nombre de cellules adhérentes augmente avec l'augmentation de la rugosité de la surface des matériaux (Figure 34a). Des études antérieures ont rapporté que le nombre de cellules bactériennes adhérentes augmente avec l'augmentation de la rugosité de la surface (Oder et al., 2015; Bohinc et al., 2016; Bohinc et al., 2014). Cependant, d'autres travaux ont rapporté qu'aucune relation claire n'a été obtenue entre la rugosité de surface et l'adhésion bactérienne (Hilbert et al., 2003; Boulanger and Edelstein, 1995; Kawai et al., 2000). Outre la rugosité, l'hydrophobicité et les interactions acide-bases ont également montré qu'ils jouent un rôle important dans l'adhésion bactérienne à la surface ; une corrélation positive a été observée

entre le nombre des cellules adhérentes aux différents matériaux et leur caractère donneur d'électrons ( $R^2=0.5566$ ) et accepteur d'électrons ( $R^2=0.4111$ ). Par contre, aucune corrélation n'a été observée en se basant sur l'hydrophobicité de surface et le nombre de cellules adhérentes ( $R^2=0.0336$ ). Teixeira et al. (2008) ont montré qu'aucune corrélation n'a été trouvée entre l'hydrophobicité ou la rugosité de surface et l'intensité d'adhésion bactérienne, et ont supposé que l'adhésion devrait dépendre d'autres facteurs, comme la présence d'exopolymères. Dans le même contexte, Bengourram et al. (2009) ont constaté que la rugosité des matériaux était un paramètre important influençant les propriétés physicochimiques du substrat, une valeur minimale de l'hydrophobicité pour une rugosité extrême ( $R_a = 0,79 \mu\text{m}$ ). Ces observations peuvent être expliquées par le degré de rugosité de surface des matériaux étudiés, leur origine et la finition qui ont subis ainsi que les espèces bactériennes, leur origine et leurs conditions de culture. En ce qui concerne l'effet de l'hydrophobicité, on constate que l'adhésion est plus élevée aux matériaux hydrophobes qu'aux matériaux hydrophiles, mais en raison de leur rugosité différente, l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons peuvent ne pas être le facteur déterminant. Sur la base des résultats obtenus ici, nous suggérons que l'adhésion de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 aux différents substrats est principalement régie par la rugosité de la surface.

## V. Conclusion

Les résultats de notre étude montrent que *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 sont capable d'adhérer à la surface des matériaux de plomberie étudiées à l'exception du cuivre. L'acier galvanisé est le matériau le plus colonisé par *L. pneumophila* suivi par le PVC, toutefois, la faible intensité d'adhésion a été observé sur l'acier inoxydable.

De plus, cette étude a également montré que l'adhésion de *L. pneumophila* au substrat dépend principalement de la rugosité de surface en tant que paramètre déterminant, suivie du caractère donneur/accepteur d'électrons. Une telle information pour comprendre ces mécanismes est essentielle pour trouver des moyens non seulement pour empêcher et prévenir la formation de biofilms et la contamination de l'eau, mais aussi pour minimiser le risque d'infection par *Legionella*.



### ✓ Adhésion de *L. pneumophila* au verre et aux matériaux de plomberie

- *L. pneumophila* adhère à la majorité des matériaux testés à l'exception du cuivre.
- L'acier galvanisé est le matériau le plus colonisé par *L. pneumophila*.
- Une faible corrélation a été observé entre l'hydrophobicité est l'adhésion de *L. pneumophila*.
- La rugosité de surface des matériels de la plomberie est le facteur principal qui gouverne l'adhésion de *L. pneumophila* aux surfaces, suivi par le caractère donneur/accepteur d'électrons.

## **Chapitre VI. Formation de biofilm par *L. pneumophila* sur les matériaux de la plomberie**

### **I. Introduction**

Dans les systèmes d'eau des bâtiments, *L. pneumophila* peut coloniser les surfaces solides et former des biofilms dans les réseaux d'eau chaude, les tours de refroidissement, les robinets et les pommes de douche (Abdel-Nour et al., 2013). Les conditions optimales favorisant sa multiplication sont la température entre 25 et 45 °C, les régimes d'écoulement et la stagnation (van der Kooij et al., 2005; Pecastaings et al., 2010). Toutefois, *L. pneumophila* peut survivre à des températures plus basses (15 ou 20°C) (Rogers et al., 1994a; Lehtola et al., 2007; Gião et al., 2009). Pour résister aux agressions extérieures (Biocides, antibiotiques...), les bactéries peuvent se regrouper et se protéger en adhérant les unes aux autres ; elles forment alors un biofilm. C'est par ce mécanisme que *L. pneumophila* résiste aux stress environnementaux ainsi qu'au traitement à savoir la chloration des eaux.

Le biofilm attaché à la surface des tuyaux est considéré comme la principale source de la contamination d'eau et d'un risque potentiel pour la santé humaine (Abdel-Nour et al., 2013). Par ailleurs, la compréhension du mécanisme de développement des biofilms bactériens et leur rôle en tant que réservoirs des agents pathogènes opportunistes dans les canalisations des systèmes d'eau, est importante. Ceci permet de limiter et maîtriser le risque de contamination de ces surfaces et de sélectionner les matériaux de conduite appropriés, qui peuvent minimiser la possibilité de développement de biofilms.

Nous avons étudié dans le chapitre précédent le phénomène d'adhésion de *L. pneumophila* aux surfaces et les principaux paramètres intervenant à ce stade. Puisque l'adhésion bactérienne aux surfaces est la première étape de la formation de biofilm, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à :

- Etudier la capacité de formation de biofilm par cette bactérie sur les matériaux de plomberie, principalement utilisés dans les systèmes de distribution d'eau au Maroc, y compris l'acier galvanisé, l'acier inoxydable, le cuivre, le PVC, le PPR et le PEX-c ;
- Suivre la cinétique de développement du biofilm sur 45 jours ;
- Etudier l'impact de la température sur la formation de biofilm par *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15.

### **II. Matériel et méthodes**

#### **II.1. Souches utilisées**

22 souches de *L. pneumophila* sg1 et 18 *L. pneumophila* sg2-15, ont été sélectionnées pour cette étude, parmi celles isolées durant notre campagne de prélèvement, au sein des établissements hôteliers.

## **II.2. Test de formation de biofilm**

Le test de formation de biofilm a été réalisé suivant le protocole cité précédemment pour le test d'adhésion. Après adhésion, chaque support a ensuite été transféré dans un autre puits (plaque à 6 puits) stérile et recouvert de 3 ml de BYE. Les plaques ont été scellées avec du parafilm et incubées à 20, 37 et 45 °C, le milieu étant remplacé chaque trois ou quatre jours.

Le développement du biofilm a été suivi sur une période de 45 jours, basé sur la détermination du nombre total de cellules. Les UFCs ont été déterminées par l'utilisation de la technique de dilution en série de la suspension bactérienne obtenue après sonication. La culture est faite sur le milieu solide Glycine-Vancomycine Polymyxin-Cycloheximide (GVPC) après incubation à 37 °C  $\pm$  2,5% CO<sub>2</sub> pendant 72h. L'expérience a été réalisée en trois exemplaires.

## **II.4. Microscopie à Force Atomique**

La microscopie à Force Atomique a été utilisée pour effectuer des mesures quantitatives de la topographie de surface. Avant la fixation, les matériaux ont été doucement rincés avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes. Les biofilms ont été fixés avec de l'éthanol/acide acétique (3:1) pendant 10 min (Chao and Zhang, 2011). Les images AFM ont été acquises par le programme « Easy scan2 » de « Nanosurf ». Nous avons utilisé le « tapping mode in air » pour la mesure et la numérisation de la topographie de surface. Chaque test de balayage a été effectué en trois exemplaires sur différentes surfaces. Les caractéristiques de la surface étudiées sont : most probable height (MPH), root mean square (rms), surface roughness, skewness et kurtosis. (La hauteur la plus probable (MPH), la rugosité moyenne de la surface (rms), l'asymétrie et l'aplatissement). Les paramètres sélectionnés sont définis et interprétés comme suit : la rugosité moyenne de surface ( $\rho$ ) est le paramètre de rugosité d'amplitude le plus largement utilisé qui donne réellement l'écart type de hauteur. Skewness ( $\zeta$ ) décrit l'asymétrie de la distribution en hauteur. Une valeur d'asymétrie égale à 0 représente une surface de distribution gaussienne. Les valeurs négatives de  $\zeta$  correspondent à une surface où les « trous » ou les « vallées » dominent, alors qu'une valeur positive indique que la surface est dominée par des « collines ». Kurtosis de surface ( $K$ ) donne une mesure de l'aplatissement de la distribution de hauteur de la surface. Pour une distribution gaussienne des hauteurs,  $\kappa = 3$ . Pour  $\kappa > 3$ , le pic est plus net et pour  $\kappa < 3$ , il est plus large qu'un pic gaussien (Chao and Zhang, 2011).

## **III. Résultats**

### **III.1. La croissance du biofilm de *L. pneumophila* sur les matériaux de plomberie à différentes températures**

Dans ce chapitre, nous avons étudié la cinétique de formation de biofilm de *L. pneumophila* et l'effet de la température sur ce phénomène. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 35. Nous avons constaté que *L. pneumophila* a une grande capacité de former le biofilm sur la majorité des matériaux

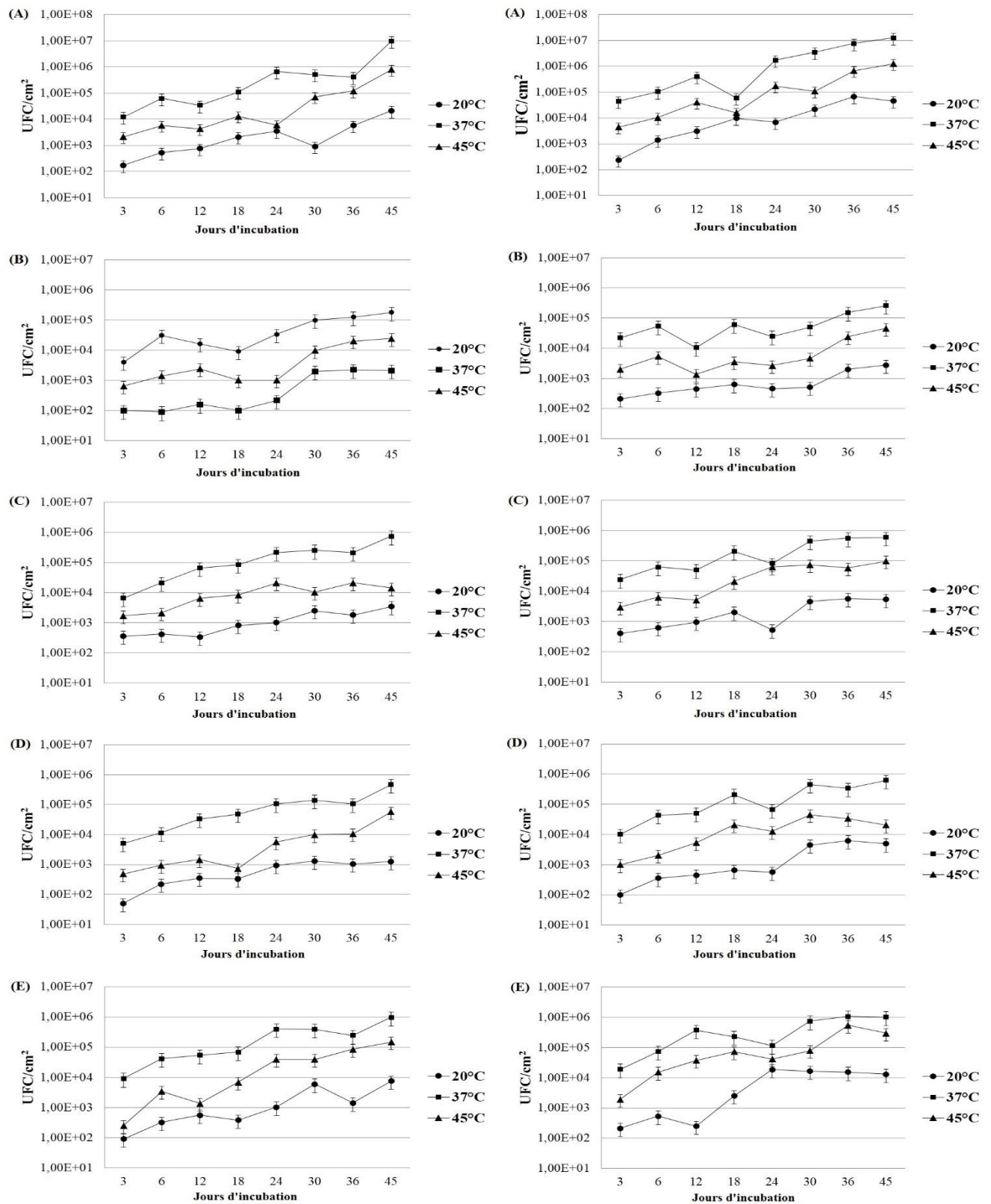
de plomberie testés à 20, 37 et 45 °C (Figure 35). A l'exception du cuivre, tous les matériaux sont rapidement colonisés par la bactérie notamment à 37°C qu'à 45 et 20°C. La colonisation initiale de l'acier galvanisé est plus rapide que celle des autres surfaces étudiées.

Aucune colonie ni récupérable après la durée de l'expérience sur la surface en cuivre ; il semblait être parmi les matériaux inhibiteurs de la colonisation bactérienne. Le nombre de cellules formant le biofilm le plus faible est de  $1,81 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> pour *L. pneumophila* sg1 et de  $2,55 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> pour *L. pneumophila* sg2-15 sur l'acier inoxydable. Toutefois, l'acier galvanisé est le plus fortement colonisé. IL favorise le plus la formation de biofilm avec un nombre de  $9,81 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> pour *L. pneumophila* sg1 et  $1,25 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> pour *L. pneumophila* sg2-15 (Figures 35).

Concernant les matériaux en plastique, le PVC apparaît comme le plus colonisé tout au long de l'expérimentation, avec un nombre de cellules récupérées de  $9,68 \times 10^5$  et  $1,02 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> respectivement pour *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15. Le PEX-c supporte un biofilm contenant jusqu'à  $7,43 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> et  $5,98 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> respectivement, pour *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15. Le PPR est le moins colonisé parmi les matériaux en plastique avec une concentration de  $4,64 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> et  $6,2 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivement pour *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15. Les nombres totaux de micro-organismes présents sur la surface des autres matériaux plastiques restent compris entre  $10^5$  et  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> pendant la durée de l'expérimentation, avec, selon un ordre croissant de colonisation, le PVC, le PEX-c et le PPR. Durant l'expérimentation, les surfaces de l'acier galvanisé et du PVC montrent des nombres de cellules formant le biofilm plus élevé que ceux des surfaces du PEX-c, PPR et l'acier inoxydable.

A 20 °C, le nombre total de cellules formant le biofilm à la surface des matériaux en plastique est systématiquement inférieur à celui détecté à 37 et 45 °C. L'intensité de formation du biofilm est supérieure à 37 qu'à 45 et 20 °C pour toutes les souches.

Nos résultats ont montré également que les souches de *L. pneumophila* sg2-15 ont une forte capacité que celle des souches de *L. pneumophila* sg1 à coloniser les matériaux de plomberie.



**Figure 35.** Croissance de biofilm de *L. pneumophila* sg1 (colonne à gauche) et sg2-15 (colonne à droite) sur l'acier galvanisé (A), l'acier inoxydable (B), PVC (C), PPR (D) et PEX-c (E).

### III.2. Microscopie à Force Atomique

Dans cette partie, nous avons examiné seulement deux souches (Lpn12 : *L. pneumophila* sg2-15 et Lpn31 : *L. pneumophila* sg1) qui ont une forte capacité de former le biofilm. La Figure 36 présente des images tridimensionnelles de l'AFM après et avant la formation du biofilm par les deux bactéries, *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15. Les résultats de l'analyse de la topographie des surfaces de biofilm ont été résumés dans le Tableau XII.

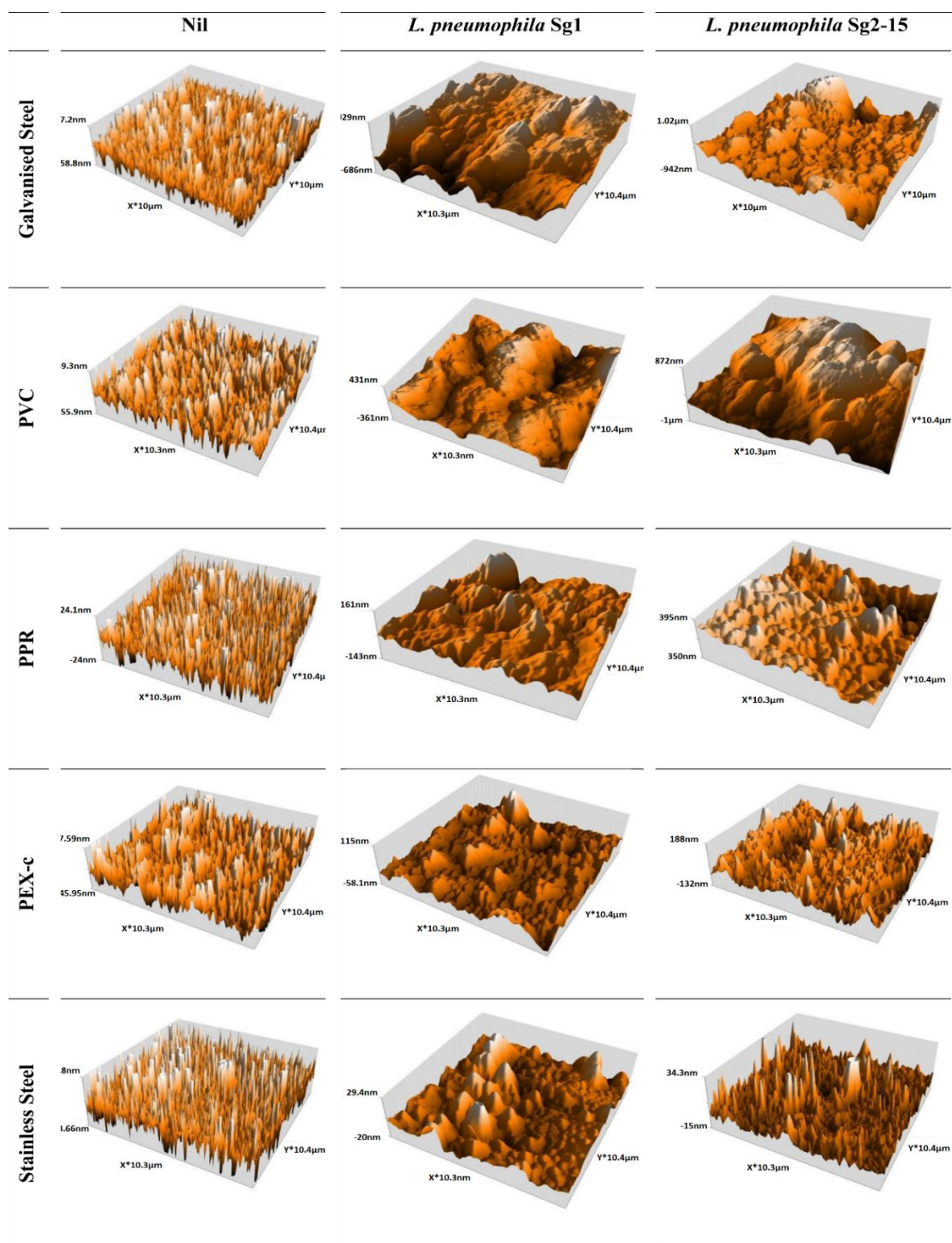
Les caractéristiques de la surface des matériaux de plomberie testés avant la colonisation bactérienne, la hauteur la plus probable ( $hm$ ), la rugosité de surface ( $\rho$ ), Skewness ( $\zeta$ ) (l'asymétrie) et Kurtosis ( $\kappa$ ) (l'aplatissement) indiquent une surface généralement plane. Globalement, les valeurs de Skewness et kurtosis, indiquant la présence d'un nombre important de trous et de vallées, avec une distribution uniforme des hauteurs (Figure 36). On observe que la formation de biofilm fait augmenter la valeur  $hm$  ainsi que  $\rho$ , comme présenté sur le Tableau XII. Pour les biofilms de 45 jours ; la plus grande hauteur est 929,1 et 1960 nm respectivement pour *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 sur l'acier galvanisé. Alors que la valeur la plus faible est de 29,3 et 34,2 nm respectivement pour *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 sur l'acier inoxydable. La rugosité du biofilm en fonction des valeurs  $hm$  est de 27,73% et 31,74% respectivement pour *L. pneumophila* sg1 et de *L. pneumophila* sg2-15 sur le PVC. Cependant, elle ne dépasse pas 20% pour le PPR, le PEX-c et l'acier inoxydable (Tableau XII).

**Tableau XII.** La distribution statistique de la hauteur de surface des biofilms

Matériaux de plomberie	Bactérie	Most probable height (nm)	Surface roughness ( $\rho$ , nm)	RMS roughness (% of $hm$ )	Skewness ( $\zeta$ )	Kurtosis ( $\kappa$ )
PVC	Néant	59.30	23.96	40.40	0.63	1
	Lpn sg 1	431.62	119.66	27.72	1.2	-0.75
	Lpn sg 2-15	627.30	199.15	31.74	1	-0.74
Acier galvanisé	Néant	67.20	26.72	39.76	-0.24	2
	Lpn sg 1	929.10	319.04	34.33	0.81	-0.13
	Lpn sg 2-15	1960	368.06	18.77	0.42	-0.73
Acier inoxydable	Néant	3.80	3.51	92.36	-0.8	3
	Lpn sg 1	29.30	5.52	18.83	-0.65	2
	Lpn Sg 2-15	34.20	4.29	12.54	-0.82	2.94
PPR	Néant	24.10	15.20	63.07	0.1	1
	Lpn sg 1	161.50	27.13	16.8	-1.01	-0.72
	Lpn Sg 2-15	395.40	67.41	17.04	-0.39	-0.57
PEX-C	Néant	47.01	16.74	35.60	-0.2	2.2
	Lpn sg 1	115.30	23.07	20.01	-0.49	1.5
	Lpn Sg 2-15	188	37.81	20.11	-0.66	2

Lpn: *L. pneumophila*; PVC : Polychlorure de vinyle, PPR : Polypropylène random copolymère, PEX-C : Polyéthylène réticulé.





**Figure 36.** Images tridimensionnelles (topographie de surface) par la microscopie à force atomique avant et après la formation de biofilm par *L. pneumophila* sg1 et sg2-15.

#### IV. Discussion

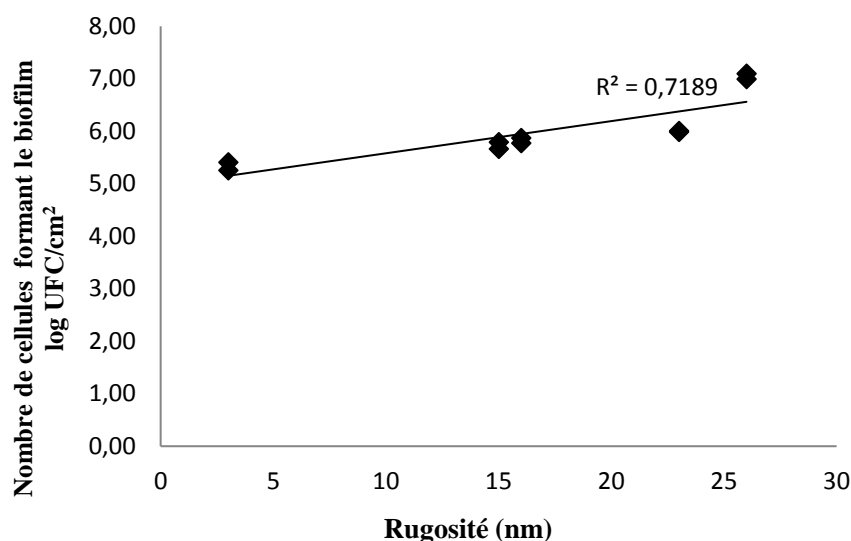
Un biofilm est une communauté microbienne adhérant à une surface biotique ou abiotique et fréquemment incluse dans une matrice de polymères exocellulaires (Donlan, 2002; Hall-Stoodley et al., 2004) et constitue la principale source de contamination des systèmes d'eau (Berry et al., 2006). Certains types de matériaux de la plomberie peuvent favoriser la formation de biofilms en raison de la libération de composés biodégradables fournissant des nutriments favorables aux micro-organismes (Keevil, 2002; Kilb et al., 2003; Rogers et al., 1994b). Dans les systèmes de distribution de l'eau, les bactéries sont généralement associées à la surface des matériaux en formant le biofilm ou en colonisant d'autres déjà existants (Bagh et al., 2004). La contamination des réseaux d'eau se produit lorsque des agents pathogènes opportunistes sont libérés à partir d'un biofilm suite à une action physique ou à un détachement actif des cellules infectieuses, ce qui peut nuire à la santé humaine, en particulier les personnes immunodéprimées (Keevil, 2003; Flemming et al., 2002).

Dans ce travail, nous avons étudié la capacité de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 à former le biofilm sur des matériaux couramment utilisés dans les systèmes de distribution d'eau au niveau national, à différentes températures. Toutes les souches étudiées sont capables de former un biofilm sur la majorité des matériaux de canalisations testés avec une capacité par ordre décroissant à 37, 45 et 20°C. La faible capacité à former des biofilms est observée à 20°C ; ce qui pourrait être expliqué probablement par la faible ou la réduction de l'activité métabolique de *L. pneumophila* à cette température (Rogers et al., 1994a; Tai et al., 2012b; Piao et al., 2006).

En comparant les deux sérogroupes, *L. pneumophila* sg2-15 a une plus grande capacité à coloniser et former le biofilm que celle observée chez *L. pneumophila* sg1 sur tous les matériaux de la plomberie et aux différentes températures testées. Ceci suggère que *L. pneumophila* sg2-15 possède une affinité élevée aux différents matériaux ce qui lui permet une adhésion rapide suivie par la formation de biofilm.

Les nombres d'UFC de *L. pneumophila* sur l'acier inoxydable sont inférieurs à ceux observés sur l'acier galvanisé et les matériaux en plastique. Cette variation de croissance en biofilm pourrait être expliquée par les différents niveaux de rugosité discutés dans les deux chapitres précédents. Une bonne corrélation a été obtenue entre la rugosité et le nombre de cellules formant le biofilm (Figure 37). L'étendue de la formation de biofilm augmente avec la rugosité de surface ; ce qui confirme les résultats de l'adhésion obtenues dans l'étude précédente (Chapitre IV). En outre, des études antérieures ont rapporté que le taux de bactéries adhérentes augmente avec l'augmentation de la rugosité de surface (Oder et al., 2015; Bohinc et al., 2016; Bohinc et al., 2014), plus la surface est rugueuse, plus les bactéries adhèrent et forment un biofilm. Cependant, d'autres chercheurs n'ont rapporté aucune relation claire entre la rugosité de surface et la colonisation bactérienne (Hilbert et al., 2003; Boulanger and Edelstein, 1995; Kawai et al., 2000). L'acier inoxydable est le matériau qui possède la plus faible rugosité. De même il est le moins colonisé par *L. pneumophila*. Cependant, des travaux antérieurs ont rapporté qu'il pourrait offrir de

nombreuses possibilités d'adhésion bactérienne et le développement ultérieur de biofilm (Cooper and Hanlon, 2010b).



**Figure 37.** Corrélation entre le nombre de cellules formant le biofilm à 37 °C et la rugosité de surface.

Ajoutant à cela que les caractéristiques et la composition des surfaces de tuyaux peuvent influencer grandement la biomasse cellulaire sur les matériaux de plomberie (Momba and Makala, 2004). Les matériaux en plastique sont connus pour lessiver des composés organiques biodégradables (plastifiants, antioxydants, lubrifiants, stabilisants thermiques) fournissant ainsi des nutriments supplémentaires aux cellules formant le biofilm (van der Kooij et al., 2005; Keevil, 2002; Kilb et al., 2003; Rogers et al., 1994b). Les composants du plastique et d'autres matériaux de plomberie peuvent également être utilisés par une partie de la communauté des micro-organismes dans le biofilm et contribuer au consortium dans son ensemble (Skjevrak et al., 2003).

L'absence de formation de biofilm a été observée uniquement sur le cuivre à toutes les températures testées ; ceci est dû à l'effet bactéricide des ions de cuivre (Rogers et al., 1994b). Il a été rapporté que les cations de cuivre pourraient attirer les cellules bactériennes chargées négativement vers la surface pour agir sur ces cellules directement, mais les ions de cuivre pourraient ne pas être libérés dans le milieu à partir du substrat (Hu et al., 2005). Il semble qu'il pourrait être considéré parmi les matériaux inhibiteurs de la colonisation bactérienne. Cependant, Lehtola et al. (2004) ont observé une formation plus lente de biofilm sur le cuivre comparé aux matériaux plastiques, mais après 200 jours d'incubation, aucune différence n'est observée entre le nombre de cellules formant le biofilm sur les deux surfaces. Wingender and Flemming (2004) ont trouvé des niveaux de formation de biofilm identiques ou même légèrement supérieurs sur le cuivre par rapport aux matériaux en acier et en plastique pendant 540 jours dans un système de distribution d'eau.

En se basant sur les résultats obtenus à partir des mesures d'AFM de la morphologie bactérienne, la hauteur et la rugosité de surface les plus probables du biofilm formé par *L. pneumophila* sg2-15 sont systématiquement plus élevées que celles de *L. pneumophila* sg1 sur les matériaux de plomberie testés ; ce qui confirme la grande capacité de *L. pneumophila* sg2-15 à former le biofilm comparé à *L. pneumophila* sg1. Dans la présente étude, *hm* et la rugosité des biofilms cultivés sur l'acier galvanisé sont aussi élevées que celles des biofilms sur le PVC, le PEX-c et le PPR au 45 jours. *hm* et la rugosité du biofilm sur l'acier galvanisé sont supérieures à celles des matériaux en plastique et les surfaces de cuivre (Tableau XIII). Les images de surface du biofilm par AFM ont montré une formation typique de cônes et de dômes par les souches testées (Figure 36). Ces résultats ont montré que le biofilm bactérien formé à la surface des matériaux de plomberie augmente la rugosité (rms), ce résultat est en accord avec ce qui a été observé par Chatterjee et al. (2014). En outre, la faible Skewness et Kurtosis des matériaux de plomberie semblent favoriser l'adhésion bactérienne. Les biofilms de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 ont des distributions de hauteurs presque gaussiennes sur les surfaces en acier inoxydable, PPR et PEX-c, avec un caractère ondulant sur les surfaces en acier galvanisé et en PVC.

Notre étude démontre la capacité de *L. pneumophila* à former le biofilm sur les différents matériaux de canalisations couramment utilisés pour la distribution de l'eau au Maroc et ceci à trois températures 20, 37 et 45°C. En effet, le biofilm représente un réservoir pour *L. pneumophila* et d'autres bactéries pathogènes, il constitue également la source de la contamination de l'eau et par conséquent un risque pour la santé humaine. A cet effet, les établissements recevant du public y compris les établissements hôteliers ayant des points d'utilisation à risque (douches, spas, etc.) doivent mettre en place une procédure de surveillance de leurs installations de production, de stockage et de distribution d'eau.

## V. Conclusion

Les résultats de ce travail montrent la colonisation rapide de surface des matériaux de plomberie, par *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15, à différentes températures. Ces données peuvent contribuer à faire le bon choix des matériaux appropriés et les plus hygiéniques pour la distribution d'eau. Comprendre les mécanismes de formation et de développement du biofilm sur les matériaux de plomberie ainsi que leur effet est primordial pour développer des stratégies pour prévenir la formation du biofilm de *L. pneumophila* dans les systèmes d'eau et limiter les risques sanitaires et les infections associées à la prolifération des bactéries pathogènes dans l'eau. Ce travail pourrait être également pris en compte pour établir des procédures de nettoyage et désinfection.

Le prochain chapitre de cette partie sera consacré à l'étude de l'effet du chlore et de chlorure de sodium sur la survie de *L. pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm. Le chlore comme étant le plus utilisé pour la désinfection des réseaux de distribution d'eau, et le chlorure de sodium comme étant une approche alternative pour l'élimination ou la réduction de la croissance et la contamination des systèmes d'eau par cette bactérie pathogène.



✓ **Etude de la formation de biofilm par *L. pneumophila* sur les matériaux de plomberie**

- L'acier galvanisé est le matériau favorisant le plus la formation du biofilm.
- Aucune colonisation n'a été observé sur le cuivre.
- Le PVC est le plus colonisé parmi les matériaux en plastiques tout au long de l'expérimentation.
- La capacité de formation du biofilm est bien exprimée à 37°C, moyenne à 45°C et faible à 20°C.
- Le séroroupe 2-15 présente une capacité de formation de biofilm élevé par rapport à *L. pneumophila* sgl.

## Chapitre VII. Effet du chlore sur la survie de *Legionella pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm

### I. Introduction

Les légionelles sont normalement attachées aux surfaces des systèmes d'eau, associées à d'autres bactéries dans une matrice extracellulaire connue sous le nom de biofilm, et survivent en tant que bactéries intracellulaires au sein des amibes libres. Plusieurs auteurs ont signalé que l'adoption de ce mode de vie, *Legionella*, comme d'autres bactéries, deviennent plus résistantes au stress environnemental et moins sensibles à tout traitement ou désinfection (Abdel-Nour et al., 2013).

Il existe diverses méthodes de désinfection impliquant des moyens physiques (par exemple, filtration sur membrane), thermiques (par exemple, pasteurisation thermique) et chimiques (par exemple chloration). Les méthodes physiques, telles que la filtration membranaire, n'ont pas été largement utilisées (Kim BR et al., 2002). Pour la désinfection de l'eau potable, les méthodes chimiques utilisant des désinfectants (le chlore étant le plus populaire) ont été les plus largement utilisées. Deux parmi les techniques de désinfection les plus couramment utilisées dans le monde contre *Legionella* sont la chloration et le traitement thermique. Le chlore libre est principalement utilisé à faible concentration (0,2-0,5 mg/L) comme désinfectant secondaire pour le maintien de la qualité de l'eau dans les réseaux de distribution, ou à des concentrations plus élevées comme traitement de désinfection de l'installation appelé l'hyperchloration (Deborde and Von Gunten, 2008; Cooper and Hanlon, 2010b). Ce processus n'est généralement efficace que pour de courtes périodes (Szewzyk et al., 2000; Garcia et al., 2007). Dans le cas des traitements thermiques, comme suggéré par l'Organisation Mondiale de la Santé, la température de départ de l'eau est maintenue à au moins 60 °C à la sortie de l'unité de chauffage et à moins 50°C lorsqu'elle atteint le robinet (Bartram, 2007). Cependant, même ces températures se sont révélées insuffisantes pour contrôler la prolifération de *Legionella* dans les systèmes d'eau chaude de plusieurs bâtiments (Mouchtouri et al., 2007a; Serrano-Suarez et al., 2013). De nombreux auteurs ont testé la réponse de *Legionella* en présence de chlore libre à une concentration de 2 mg/L ; mais n'ont pas observé de réduction significative du nombre de cellules (Cooper and Hanlon, 2010b; Bodet et al., 2012). En revanche, plusieurs autres études ont montré un succès et une efficacité de différentes méthodes d'élimination des bactéries du genre *Legionella* dans les systèmes de plomberie internes par la chloration et le traitement thermiques (Stout and Yu, 2003; Chen et al., 2005; Declerck et al., 2007; Zhang and Kuspa, 2009; Lin et al., 2011). Les opinions sur l'efficacité du chlore et d'autres méthodes d'élimination de ces bactéries diffèrent (Goldstone et al., 2012). Puisque la plupart des procédures d'élimination sont souvent infructueuses, il est important de déterminer les raisons de l'apparition fréquente de ces espèces bactériennes dans certains environnements. Le but de la présente étude est d'étudier l'effet de la désinfection par le chlore sur les cellules de *L. pneumophila* à l'état planctonique

et en biofilms formés sur la surface de matériaux de la plomberie, l'acier galvanisé et le PVC, fortement colonisés par *L. pneumophila*, comme il a été démontré dans le chapitre précédent.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Souches bactériennes, conditions de culture et préparation de la suspension bactérienne

Les souches utilisées dans cette étude sont *L. pneumophila* séro groupe 1 et *L. pneumophila* séro groupe 2-15 obtenues comme décrit précédemment. Les souches de *L. pneumophila* ont été cultivées sur le milieu solide Glycine-vancomycine-polymyxine-cycloheximide (GVPC) à 37°C ± CO<sub>2</sub> (2,5%) pendant 72h. Après la culture, les cellules ont été récoltées par centrifugation pendant 15 min à 8400 g et ont été lavées deux fois et remises en suspension dans une solution de KNO<sub>3</sub> de force ionique 0,1 M.

### II.2. Chloration des cultures planctoniques

La survie des souches environnementales de *L. pneumophila* en culture planctonique a été étudiée comme suit : L'eau du robinet stérile et le bouillon d'extrait de levure ont été préparés en volumes de 10 mL et trois séries de test ont été réalisées. La première série est complétée avec la L-cystéine, la deuxième a été complétée avec de la L-cystéine et du chlore à 0,2-0,5 mg/L ; concentration maximale recommandée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Cooper and Hanlon, 2010b), et la troisième série ne contient ni chlore ni L-cystéine. Tous les tubes d'essai ont été inoculés avec 100µl de la suspension bactérienne (10<sup>6</sup>UFC/ml), scellés et incubés à 37 °C. L'analyse a été effectuée en triple sur chaque échantillon, où des aliquotes de 1mL ont été prélevées aux jours 3, 6, 12, 18, 24 et 30 et soumises à une dilution en série de 10 fois et un volume de 100 µL a été inoculés sur gélose GVPC incubée à 37 °C pendant 72h.

### II.3. Test de formation du biofilm

Le test de formation de biofilm sur les deux matériaux par *L. pneumophila* est réalisé comme a été décrit précédemment (Chapitre VI).

Le développement du biofilm a été suivi sur une période de 45 jours, sur la base de la détermination du nombre total de cellules. Les unités formant des colonies ont été déterminées en utilisant la technique de dilution en série de la suspension bactérienne obtenue après sonication sur GVPC après incubation à 37 °C (2,5% CO<sub>2</sub>) pendant 72 h.

### II.4. Hyperchloration

La chloration a eu lieu les jours 18 et 30 pour le biofilm précédemment formé sur chaque matériau par des concentrations de 50, 100, 150 et 200 mg/L. 1mL de la solution de chlore appropriée a été ajouté à chaque puits et laissé pendant 2 heures à température ambiante. Après traitement, chaque disque a été placé dans 3 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 2 mg/L afin de neutraliser tout le chlore résiduel et laissé pendant 3 minutes à température ambiante. Chaque matériau a ensuite été transféré

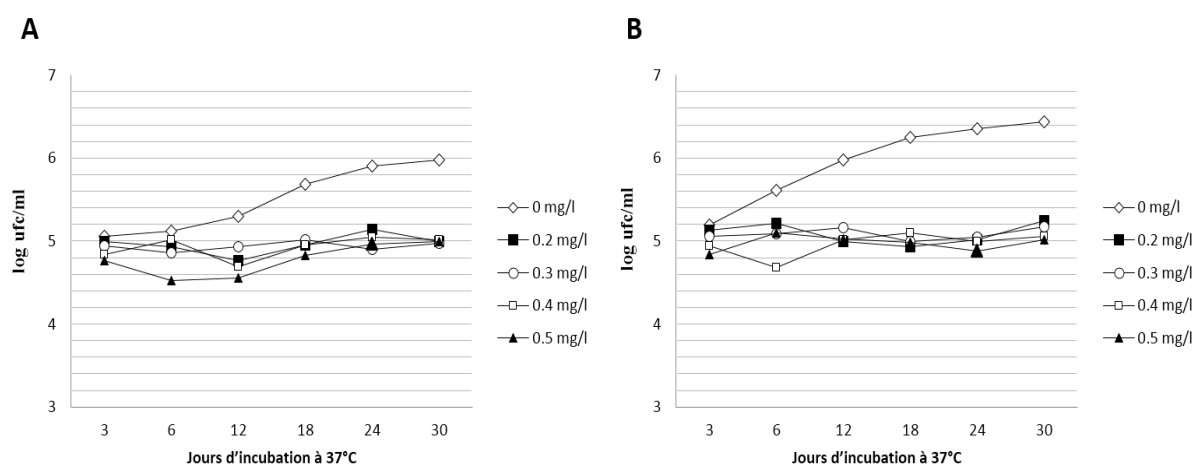
dans une autre plaque stérile à 6 puits, recouvert par 3mL de  $\text{KON}_3$  (0,1 M) et agité doucement pendant une minute à température ambiante pour éliminer les cellules non adhérentes ainsi que le thiosulfate de sodium ou le chlore résiduel. Finalement, les matériaux ont été transférés dans de nouvelles plaques à 6 puits stériles contenant 3 ml de BYE plus de la L-cystéine dans chaque puits ; les plaques ont été ensuite scellées avec du parafilm et incubées à 37 °C. Le nombre d'unités formant des colonies (UFC) a été déterminé aux jours 3, 6, 12, 18, 24, 30 et 45 selon la méthodologie décrite ci-dessus.

### III. Résultats

#### III.1. Effet du chlore sur les cellules planctoniques

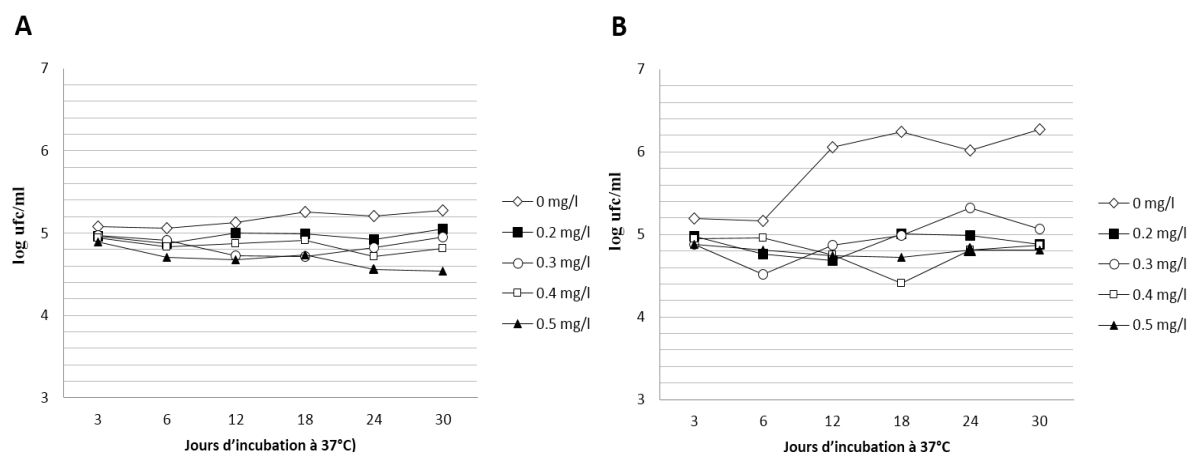
Nous avons étudié la capacité des cellules planctoniques de *L. pneumophila* à survivre le traitement par le chlore à des niveaux similaires à ceux utilisés dans les systèmes d'eau potable allant de 0,2 à 0,5 mg/L.

Les Figure 38 et 39 montrent que *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg 2-15 ont pu survivre et persister dans l'eau du robinet stérile avec un nombre croissant allant de  $10^5$  à  $10^6$  UFC/mL. Des unités formant des colonies ont été détectées tout au long de la période expérimentale dans l'eau de robinet stérile et le BYE additionnés de chlore (0,2-0,5 mg/L) à 37°C. Ces résultats suggèrent que ces concentrations de chlore n'étaient pas suffisantes pour réduire le nombre des légionelles pouvant parfois survivre dans des eaux jugées acceptables sur le plan microbiologique.



**Figure 38.** Survie de la souche *L. pneumophila* sg 2-15 dans l'eau du robinet stérile (A) et le milieu BYE (B) en présence et en absence du chlore à différentes concentrations

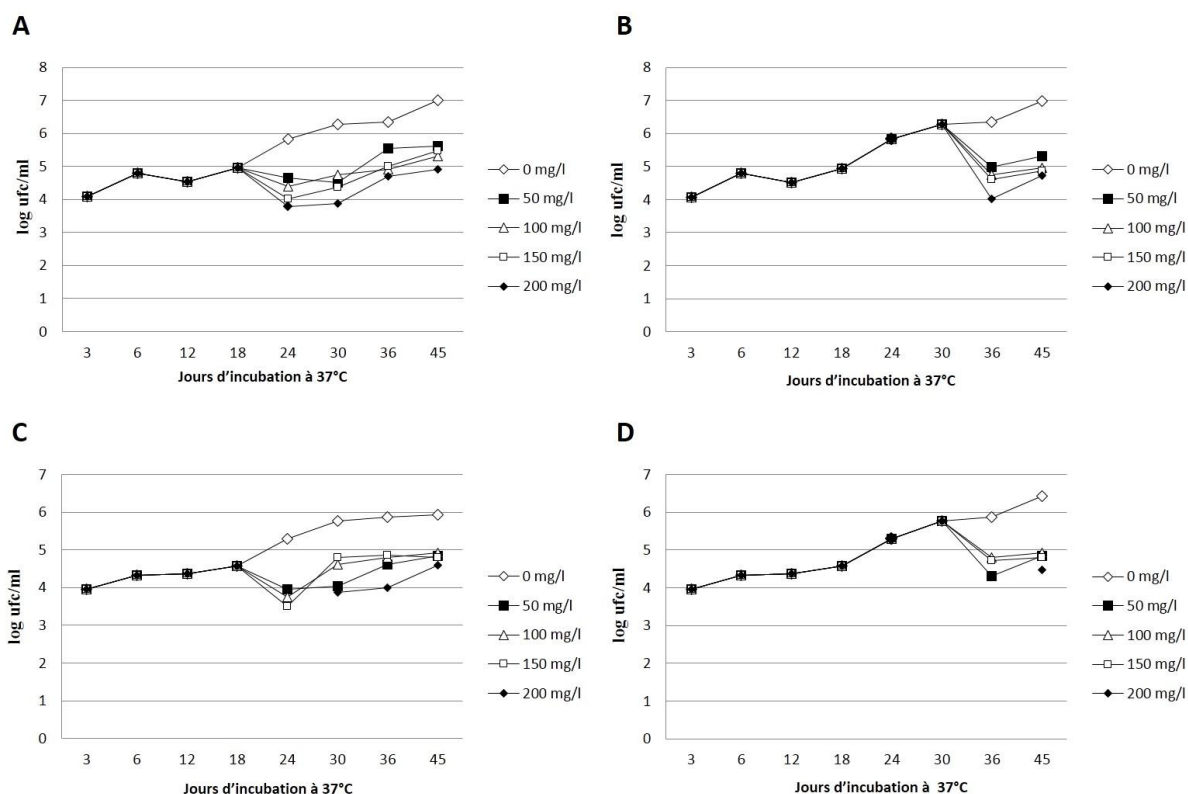




**Figure 39.** Survie de la souche *L. pneumophila* sg 1 dans l'eau du robinet stérile (A) et le milieu BYE (B) en présence et en absence du chlore à différentes concentrations

### III.2. Effet du chlore sur le biofilm

Le biofilm a été cultivé sur des matériaux d'acier galvanisé et de PVC. Ces deux matériaux ont été rapidement colonisés par *L. pneumophila* comme il a été décrit précédemment, et la chloration a eu lieu aux jours 18 et 30 pour examiner l'effet du chlore sur le biofilm de 18 et 30 jours. Les Figures 40 et 41 montrent la croissance du biofilm de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* 2-15 sur l'acier galvanisé et le PVC soumis à diverses concentrations de chlore aux jours 18 et 30. Le nombre total de cellules augmente rapidement à la surface des matériaux non-chlorés (non traités). L'acier galvanisé est le matériau le plus colonisé et qui favorise plus la formation du biofilm. Il a montré  $9,81 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> pour *L. pneumophila* sg1 et  $1,25 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> pour *L. pneumophila* sg2-15. Le résultat a révélé que pendant la durée de l'expérience (45 jours), les deux souches se sont développées, à peu près, au même rythme sur l'acier galvanisé et le PVC (Figure 40 et 41).



**Figure 40.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg1 formé sur l'acier galvanisé (A&B) et le PVC (C&D) après traitement le 18<sup>ème</sup> (A&C) et le 30<sup>ème</sup> jour (B&D).

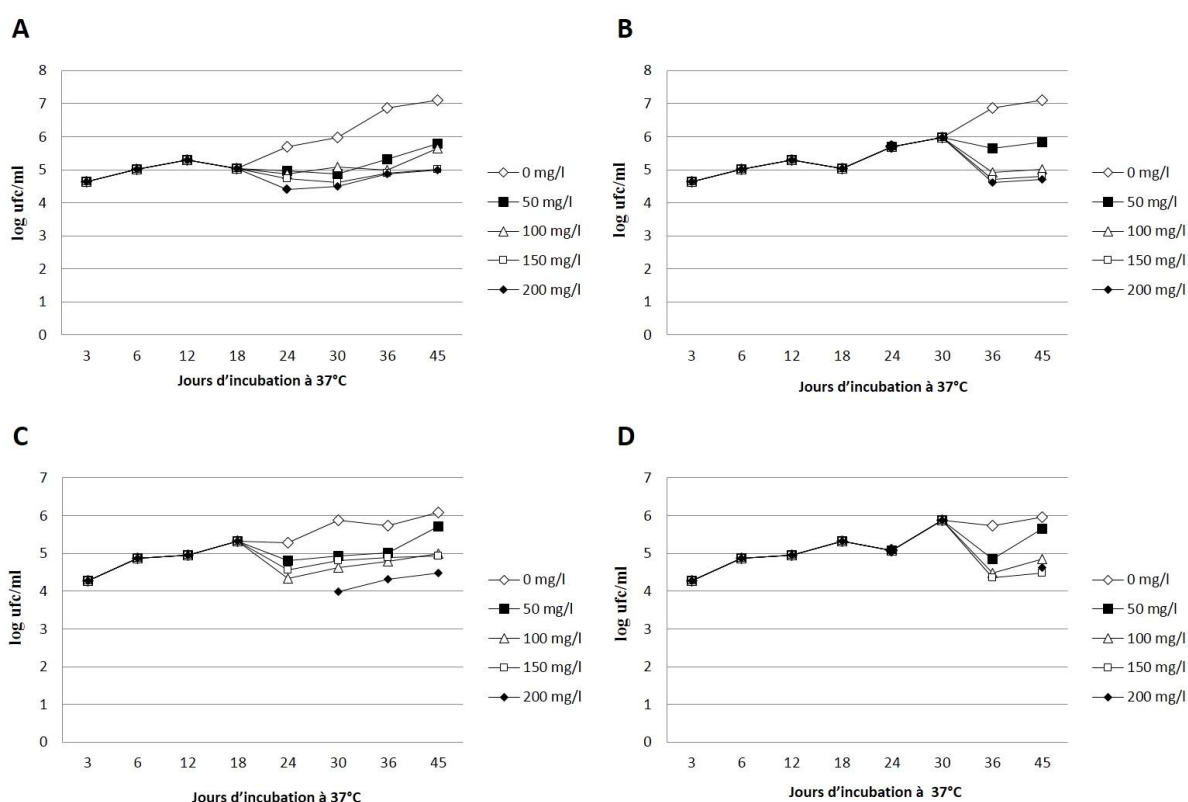
Les biofilms de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 ont diminué en nombre de cellules viables après exposition au chlore à diverses concentrations testées. Plus en augmente la concentration le nombre de cellules formant le biofilm diminue.

Pour les biofilms de *L. pneumophila* sg1 de 18 jours (Figure 40A-40C), le plus grand taux de réduction a été observé à 100 mg/L (1,5 unité de logarithme), alors que pour *L. pneumophila* sg2-15 (Figure 41A-41C) ce taux est de 2,794 log après exposition à 150mg/L.

Les Figures 40(B)-40(D) et 41(B)-41(D) montrent respectivement la réponse des biofilms de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* 2-15 à la chloration à 50, 100, 150 et 200 mg/L au 30<sup>ème</sup> jour d'incubation. Après une baisse initiale du nombre de cellules viables, les biofilms sont devenus 100 fois plus petits que les témoins négatifs. La majorité des biofilms exposés au chlore ont atteint 5,79 log pour *L. pneumophila* sg2-15 et 5,6 log pour *L. pneumophila* sg1 sur l'acier galvanisé, comparativement à  $9,81 \times 10^6$  UFC/mL pour *L. pneumophila* sg1 et  $1,25 \times 10^7$  UFC/mL pour *L. pneumophila* sg2-15 sur les matériaux non chlorés, indiquant une diminution mesurable du nombre des UFC détectables, résultant directement de l'application de chlore. Pour les biofilms de *L. pneumophila* sg1 de 30 jours, le plus grand taux de réduction après exposition à 200 mg/L (>1.5 log), et pour *L. pneumophila* sg2-15, le plus grand

taux de réduction a été observé après exposition à 150mg/l (>1 log). Comme pour les biofilms de 18 jours, le chlore n'a pas détruit toutes les cellules du biofilm qui a continué à croître, mais à des niveaux inférieurs à ceux du témoin non chloré.

Directement après chloration, aucune des deux souches de *L. pneumophila* testées n'était détectable. Le nombre d'UFC récupérés pendant le reste de l'expérience à partir des biofilms exposés aux différents niveaux de chlore n'a pas atteint l'ampleur des biofilms témoins non chlorés, bien que le nombre de tous les biofilms chlorés ait augmenté par la suite.



**Figure 41.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg2-15 formé sur l'acier galvanisé (A&B) et le PVC (C&D) après traitement le 18<sup>ème</sup> (A&C) et le 30<sup>ème</sup> jour (B&D).

#### IV. Discussion

Au cours des dernières années, *Legionella* a été isolée des systèmes d'eau chaude des hôtels, des hôpitaux et des bâtiments domestiques. Dans un certain nombre de cas, la présence de *Legionella* dans les systèmes de plomberie était en cause d'infection chez l'homme. Malgré une surveillance accrue et des progrès dans les méthodes de détection, il existe encore un manque de connaissances sur l'écologie microbienne de *Legionella* et sa réponse aux traitements, notamment en état de biofilm. Par conséquent, la contamination des systèmes d'eau chaude par *Legionella* reste un défi environnemental persistant et une menace pour la santé publique.

Plusieurs études de désinfection ont été étudiées pour éliminer et contrôler la colonisation et la prolifération de *Legionella* dans les systèmes d'eau et ceci par l'utilisation de divers désinfectants chimiques (chlore, monochloramine, ...) et physiques (chaleur, UV, ...) (Campos et al 2003, Kim BR et al., 2002). L'hyperchloration de l'eau potable est habituellement effectuée à l'aide d'agents chimiques tels que le chlore et l'hypochlorite de sodium et est recommandée pour le traitement des systèmes de distribution d'eau des établissements résidentiels. Cette approche peut être appropriée pour le traitement et l'élimination des cellules planctoniques de *L. pneumophila*, mais reste inefficace contre les biofilms. En cas d'échec du traitement, *L. pneumophila* pourrait être en mesure de recoloniser les systèmes d'eau. On a émis l'hypothèse que cette recolonisation est rendue possible parce que *Legionella* est protégée dans le biofilm ou dans les amibes.

Nous avons examiné l'effet de la désinfection par le chlore sur *L. pneumophila* dans des conditions contrôlées. L'acier et les matériaux en plastiques sont devenus les matériaux dominants fréquemment utilisés pour la distribution de l'eau potable dans les nouveaux bâtiments. L'hyperchloration, fréquemment utilisée comme traitement curatif, consiste généralement en une injection de chlore dans l'eau par impulsion pour atteindre 20 à 50 mg/L de chlore dans le système pendant une courte période de temps (Campos et al., 2003). Sur la base des résultats obtenus précédemment, nous constatons que l'acier galvanisé et le PVC fournissent des conditions favorables pour l'adhésion de *L. pneumophila* et la croissance du biofilm. Dans ce chapitre, la désinfection au chlore des cellules planctoniques et les biofilms de *L. pneumophila* (in vitro) a révélé que les périodes 18 et 30 jours sont suffisantes pour qu'une communauté de *L. pneumophila* devienne résistante à des concentrations qui dépassent les recommandations de l'OMS. L'exposition des cellules planctoniques de *L. pneumophila* au chlore a révélé une résistance in vitro dépasse largement la limite maximale admissible dans l'eau potable (0,5mg/L). En outre, l'exposition du biofilm de *L. pneumophila* au chlore a montré une résistance et une persistance très remarquable à la concentration recommandée d'hyperchloration. Ces résultats expliqueraient la survie et la persistance de *L. pneumophila* dans les systèmes d'eau potable malgré des cycles répétés de chloration.

La non détection par culture des cellules de *L. pneumophila* immédiatement après hyperchloration peut être expliqué par le fait que *Legionella* dans les environnements stériles (faibles quantités en nutriments, traitement chimique, etc) peut se transformer en un état de bactéries vivantes mais non cultivables dite VBNC (Viable but not cultivable), cet état particulier entraîne une sous-estimation des populations de *L. pneumophila* par culture (Alleron et al., 2008; Steinert et al., 2007).

Par ailleurs, les souches environnementales pourraient être exposées à des cycles répétés de chloration, ce qui a peut-être conduit au développement d'un mécanisme de résistance aux traitements de désinfection au chlore. Les informations obtenues à partir de cette étude pourraient suggérer une persistance à la chloration des souches de *L. pneumophila*, où l'exposition au chlore à intervalles réguliers a facilité une plus grande tolérance au désinfectant.

## V. Conclusion

Les données présentées dans cette étude suggèrent que les souches de *L. pneumophila* en phase planctonique et sessiles peuvent persister dans l'eau chlorée à des concentrations élevées. Nos résultats confirment que les concentrations recommandées par l'OMS (0,2-0,5mg/L) semblent ne pas être suffisante pour tuer les cellules planctoniques de *L. pneumophila*. En outre, la chloration à une concentrations allant jusqu'à 200mg/L ne semblent pas être efficace pour éradiquer un biofilm de *L. pneumophila* déjà installé. Par conséquent, de nouvelles approches pour surveiller et éradiquer cette bactérie des systèmes et des réseaux d'eau sont nécessaires pour éviter un risque exposition éventuel par cette bactérie pathogène.



✓ **Effet du chlore sur la survie de *Legionella pneumophila* en état planctonique et en biofilm**

- Les concentrations résiduelles en chlore recommandé par l'OMS semblent ne pas être efficace pour tuer les cellules planctoniques de *L. pneumophila*.
- Des concentrations d'hyperchloration allant jusqu'à 200 mg/L ne sont pas suffisante pour éradiquer le biofilm déjà installée sur les deux matériaux très utilisés au niveau national.
- Les cellules du biofilm persistantes à l'hyperchloration ont réussi à reprendre leur croissance pendant les jours suivants, mais à des concentrations inférieures à celles du témoin non-chloré.
- Quel que soit le matériau testé (acier galvanisé ou PVC), aucune différence n'a été observé, en termes d'efficacité du traitement

## **Chapitre VIII. Effet de la salinité sur la survie de *L. pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm**

### **I. Introduction**

Apart qu'elle est une bactérie pathogène opportuniste pouvant être impliquée dans la contamination des systèmes de plomberie (Eboigbodin et al., 2008; Keevil, 2002), *Legionella* est un agent récalcitrant capable de recoloniser les systèmes d'eau même après des cycles répétés de désinfection (Cooper and Hanlon, 2010b). La chloration et la désinfection thermique sont les deux méthodes de désinfection habituellement utilisées dans le monde, mais malgré les avantages qu'elles présentent, elles sont chères et peuvent générer des effets incontestables sur la détérioration des matériaux de la conduite et la canalisation. Afin d'améliorer l'efficacité du traitement et de trouver une approche efficace, saine et moins couteuse pour la désinfection des réseaux d'eau et le contrôle de la colonisation bactérienne de *Legionella*, le but de la présente étude est d'étudier l'effet du chlorure de sodium (NaCl) en association avec deux température différentes (20 et 37 °C) sur la survie de *L. pneumophila* en état planctonique et en biofilm. Le chlorure de sodium est choisi comme une approche alternative proposée pour les établissements hôteliers qui sont situés dans les villes côtières afin d'utiliser l'eau de mer pour désinfecter leurs systèmes de distribution d'eau chaude, réduire et minimiser la colonisation et la prolifération de *L. pneumophila*.

### **II. Matériel et méthodes**

#### ***II.1. Souches bactériennes, conditions de culture et préparation de la suspension bactérienne***

Les souches utilisées dans cette étude sont *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* s2-15 isolées des systèmes de distribution d'eau des établissements hôteliers comme décrit précédemment. Les souches de *L. pneumophila* ont été cultivées sur le milieu solide Glycine-vancomycine-polymyxine-cycloheximide (GVPC) à 37 °C ± CO<sub>2</sub> (2,5%) pendant 72h. Après la culture, les cellules ont été récoltées par centrifugation pendant 15 min à 8400 g, lavées deux fois et remises en suspension dans une solution de KNO<sub>3</sub> d'une force ionique 0,1M.

#### ***II.2. Effet du chlorure de sodium sur les cellules planctoniques***

La survie des souches environnementales de *L. pneumophila* en culture planctonique a été étudiée comme suit : Le chlorure de sodium a été dissous dans de l'eau distillée, passé à l'autoclave et distribué dans des tubes à essai (10 ml). Cinq solutions différentes ont été préparées pour étudier la tolérance au chlorure de sodium. Les concentrations testées sont : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 4% de NaCl. L'eau distillée stérile a été utilisée comme témoin.

L'effet de deux températures différentes sur la survie de *L. pneumophila* dans des solutions de NaCl a été testé. Chaque concentration de NaCl a été examinée à 20 et 37°C. Tous les tubes à essai ont été inoculés avec 100µl de la suspension bactérienne (10<sup>6</sup> cfu/mL) et incubés à 37°C pendant 72 h. Les

unités formant des colonies ont été déterminées après 6, 24, 48, 72 et 96 h. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 72 h. L'analyse a été effectuée en triple.

### ***II.3. Effet du chlorure de sodium sur le biofilm de *L. pneumophila****

Cette étude est réalisée en utilisant les microplaques à 24 puits. 3 millilitres du bouillon d'extrait de levure additionné de la L-cystéine (BYE) ont été ajoutés à chaque puits avec un volume de 100µL de l'inoculum. Les plaques ont été scellées avec du parafilm et incubées à 37 °C, le milieu étant remplacé à des intervalles de deux ou trois jours. Le développement du biofilm a été suivi sur une période de 20 jours, basé sur la détermination du nombre total de cellules. Les UFC ont été déterminés en utilisant la technique de dilution en série de la suspension bactérienne obtenue après sonication sur GVPC après incubation à 37 ° C  $\pm$  2,5% de CO<sub>2</sub> pendant 72 h.

Le choc salin a eu lieu les jours 6 et 15 pour le biofilm formé précédemment dans chaque puits. Le chlorure de sodium a été préparé dans de l'eau distillée stérile pour fournir des concentrations de 1 ; 2 ; 4 et 8%. Les microplaques à 24 puits ont été rincées deux fois avec 3 ml d'eau distillée stérile et agitées doucement pour éliminer les cellules non adhérentes, puis 3 ml de chaque concentration de NaCl ont été ajoutés à chaque puits. Les microplaques sont recouvertes et incubées à la température ambiante pendant 6 heures. Ensuite, les microplaques ont été rincées deux fois avec 3mL d'eau distillée stérile pour éliminer tout le chlorure de sodium résiduel. Les cellules adhérentes ont été détachées par sonication (2 min/60 kHz). Le nombre d'unités formant colonies a été déterminé immédiatement après le choc et après 6, 10, 15, 18 et 20 jours. Les boîtes ont été incubées à 37 °C  $\pm$  2,5% de CO<sub>2</sub> pendant 72 h.

## **III. Résultats**

### ***III.1. Effet du chlorure de sodium sur les cellules planctoniques***

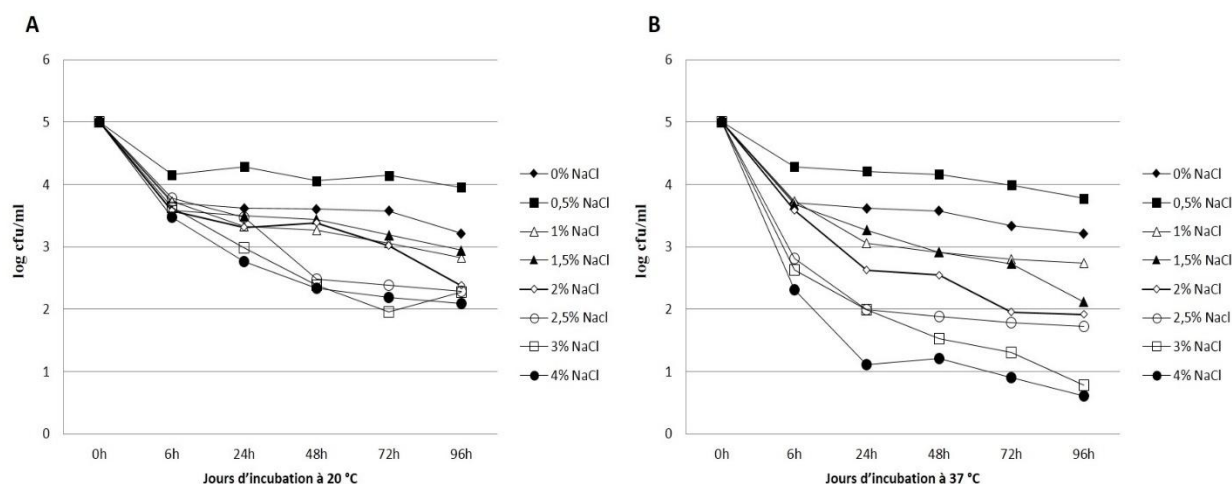
Nous avons étudié la capacité des cultures planctoniques de *L. pneumophila* à survivre dans une solution de chlorure de sodium à 20 et 37 °C. Les concentrations allant de 0,5 jusqu'à 4%. Les résultats de l'effet de chlorure de sodium sur la survie de *L. pneumophila* après incubation à 20 et 37 °C sont donnés dans les Figures 42 et 43.

Une légère diminution a été observée pendant les premières heures à 20 et à 37°C pour des concentrations inférieures à 2%.

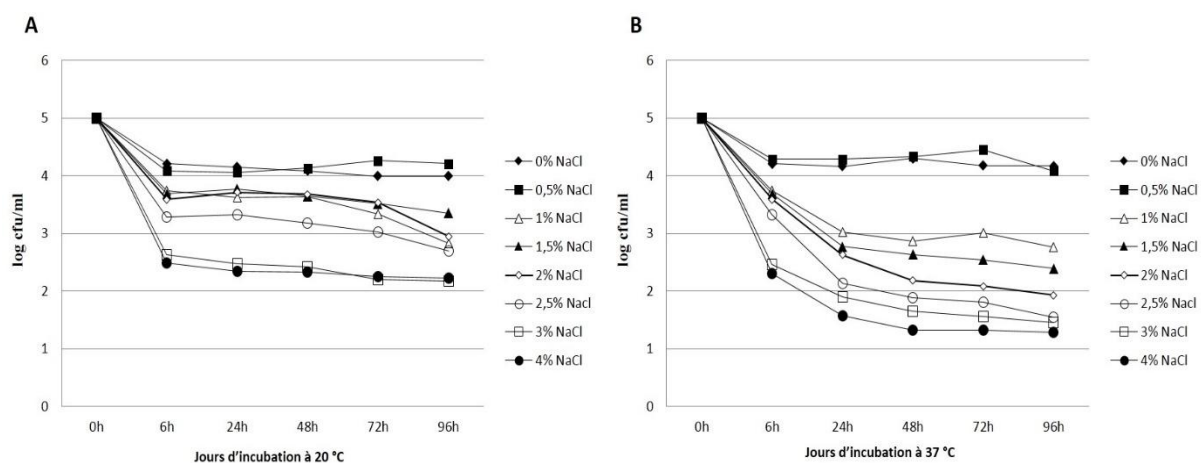
A partir de la concentration 2 et 3% on observe une diminution importante en nombre de cellules planctoniques, cette diminution est très marquée par l'augmentation de la concentration en NaCl. Une réduction continue du nombre de cellules a été observé en fonction du temps, pendant les première heures la réduction a été moyenne, par contre, après 24h la réduction en nombre de cellules s'accroît.

A 20 °C, la réduction s'est produite principalement pendant les premières heures d'incubation, après quoi le nombre de cellules est resté relativement inchangeable entre le premier et le troisième jour pour les concentrations allant jusqu'à 3% de NaCl. Les concentrations de NaCl n'ont eu aucun effet ou seulement

un effet mineur sur la réduction du nombre de cellules à des concentrations inférieures à 3% de NaCl. La réduction du nombre des cellules est d'environ 1 unité logarithmique, ce qui montre que le niveau de concentration en NaCl n'a aucun effet ou un faible effet sur la survie de *L. pneumophila*. Comme on l'a vu précédemment à basse température, des concentrations en NaCl allant jusqu'à 2 et 3% n'ont eu qu'un faible effet sur les taux de réduction, mais lorsque les concentrations salines augmentent, le nombre de cellules planctoniques diminue rapidement.



**Figure 42.** La survie de *L. pneumophila* sg1 dans l'eau de robinet stérile en présence et en absence de chlorure de sodium à différentes concentrations à 20°C (A) et à 37°C (B).



**Figure 43.** La survie de *L. pneumophila* sg2-15 dans l'eau de robinet stérile en présence et en absence de chlorure de sodium à différentes concentrations à 20°C (A) et à 37°C (B).

A 37 °C, des concentrations en NaCl relativement élevées ont eu une grande influence sur la survie de *L. pneumophila*, 96 heures après l'inoculation dans des solutions NaCl à 1 et 1,5%, la réduction est d'environ 2 unités logarithmiques, pour les concentrations 1 et 1.5%. Les réductions après 96h d'incubation en contact avec les solutions NaCl de 2 et 3% sont respectivement 1,5 et 2 unités



logarithmiques. À 4% de NaCl, la réduction a dépassé 4 unités logarithmiques. Cependant, de faibles concentrations en NaCl (0,5%) gardent le taux de survie de *L. pneumophila* constant par rapport au témoin en absence de NaCl. En comparant la survie du contrôle positif, aucune différence notable n'a été observée pendant toute la période expérimentale.

Une comparaison des courbes de survie obtenues à 20 et 37 °C a montré que la diminution du nombre de cellules est plus importante et plus prononcée à 37 °C. Ces résultats indiquent que les effets combinés de NaCl et de la température sont plus prononcés lors de la mise sous stress des bactéries avec 4% de NaCl et une température d'incubation de 37°C. Nous avons trouvé que la combinaison de la température élevée (37°C) avec des concentrations supérieures à 2% de NaCl a montré une réduction systématique du nombre de cellules bactériennes. Une meilleure efficacité de chlorure de sodium a été observé à 37°C.

### ***III.2. Effet du chlorure de sodium sur le biofilm de *L. pneumophila****

Le développement du biofilm a été suivi sur une période de 20 jours, en se basant sur la détermination du nombre total de cellules. Le biofilm a été cultivé sur des microplaques à 24 puits. Les résultats de cette étude montrent que la biomasse du biofilm augmente au fur et à mesure quand on prolonge le temps d'incubation.

Le choc salin a eu lieu les jours 6 et 15 pour le biofilm formé précédemment dans chaque puits. Des concentrations en NaCl allant de 1 jusqu'à 8% ont été testé contre le biofilm de *L. pneumophila*. Le nombre d'unités formant des colonies (UFC) a été déterminé immédiatement après le choc salin et aux jours 6, 10, 15, 18 et 20 jours.

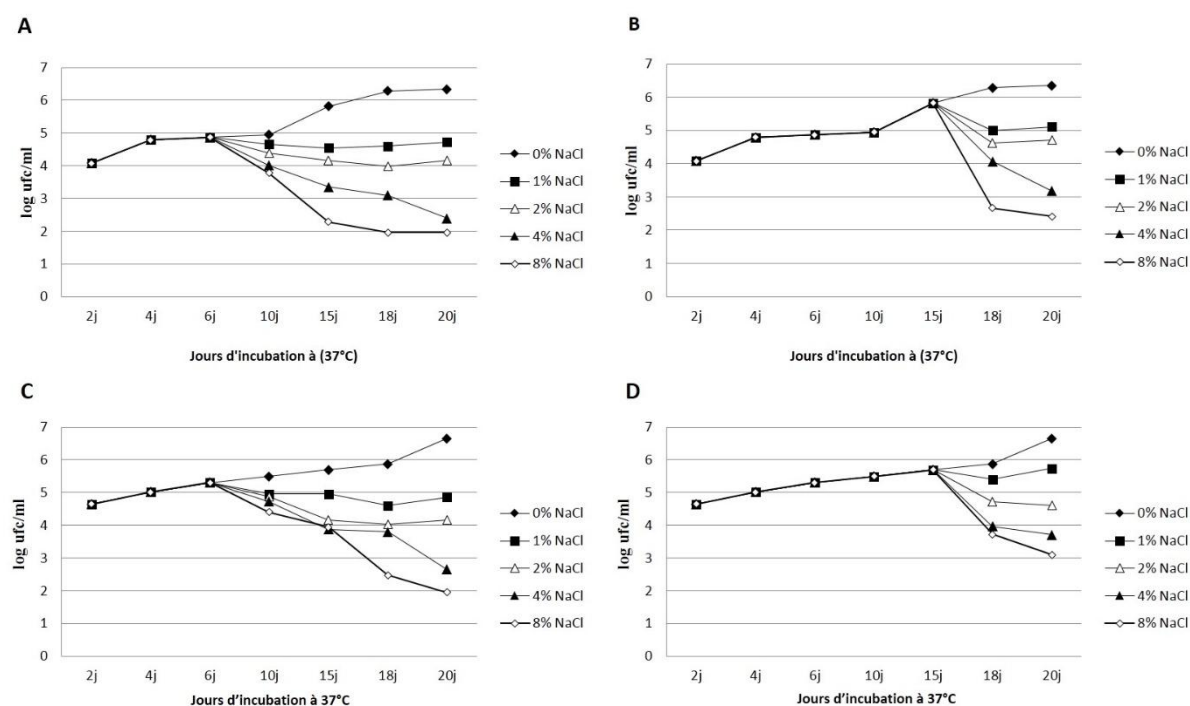
Les résultats de l'effet du NaCl sur le biofilm de *L. pneumophila* sont donnés dans la Figure 44 (Annexe6). Les biofilms des souches de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* sg2-15 ont tous les deux diminué en nombre de cellules après exposition au chlorure de sodium aux différentes concentrations testées (Figure 44).

En comparant les courbes de croissance du biofilm après le choc salin le 6ème et le 15ème jour, une faible réduction des cellules formant le biofilm a été observée après le choc à des concentrations allant jusqu'à 2%. Ce qui montre que les cellules persistantes ont repris leur croissance et ont pu développer à nouveau un biofilm les jours suivant le choc. Il est intéressant de mentionner d'aucune colonie n'a été détecté immédiatement après le choc salin. Par contre, le biofilm a repris sa croissance quelques jours après traitement. Ce qui montre que le traitement n'a pas tué toutes les cellules bactériennes et le problème de re-croissance du biofilm a eu lieu, mais à des niveaux plus faibles du témoin non traité.

Les unités formant des colonies ont été détectées six jours après le choc NaCl. Le nombre d'ufc récupéré pendant le reste de l'expérience à partir des biofilms exposés à un taux quelconque de chlorure de sodium n'a pas atteint l'ampleur des biofilms témoins positifs, bien que le nombre de tous les biofilms stimulés ait augmenté dans une progression apparemment stable.

Par ailleurs, le choc salin par des concentrations supérieures à 2%, a montré une meilleure efficacité, traduit par une diminution continue de la biomasse du biofilm.

Pour les biofilms de 15 jours, le plus grand taux de réduction a été observé après une exposition à 4% (4 unités logarithmique). Après une baisse initiale du nombre de cellules, le biofilm a connu une forte par rapport aux témoins positifs. La majorité des biofilms exposés au chlorure de sodium ont atteint 5,74 log pour *L. pneumophila* sg2-15 et 5,11 log pour *L. pneumophila* sg1 (Figure 44). La réduction du nombre de cellules formant le biofilm de six jours est supérieure à celle du biofilm de 15 jours, suggérant que le vieux biofilm est plus persistant au traitement qu'un jeune biofilm.



**Figure 44.** Effet de chlorure de sodium sur la croissance du biofilm de *L. pneumophila* après traitement de 6 heures le 6<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jour.

(A) : Croissance de *L. pneumophila* sg1 après traitement le 6<sup>ème</sup> jour

(B) : Croissance de *L. pneumophila* sg1 après traitement le 15<sup>ème</sup> jour

(C) : Croissance de *L. pneumophila* sg2-15 après traitement le 6<sup>ème</sup> jour

(D) : Croissance de *L. pneumophila* sg2-15 après traitement le 15<sup>ème</sup> jour

#### IV. Discussion

La colonisation de divers systèmes d'eau par des bactéries est de plus en plus identifiée comme une source récurrente de problèmes pour l'industrie et la société. Afin d'améliorer l'efficacité du traitement de l'eau, nous avons examiné l'effet du chlorure de sodium sur les cellules planctoniques et le biofilm de *L. pneumophila*. Nous avons aussi testé le choc par NaCl comme approche alternative pour réduire

et minimiser la colonisation et la prolifération de *L. pneumophila* dans les systèmes de distribution d'eau. Il est connu que la chloration et la désinfection thermique sont les deux méthodes de désinfections habituellement utilisées dans le monde, mais malgré les avantages qu'elles présentent, elles sont coûteuses et peuvent générer des effets non-souhaitables liés à la détérioration des matériaux et à la canalisation en général.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, de nombreuses options de désinfection existent, cependant, chacune de ces méthodes présente des avantages et des insuffisances (Gagnon et al., 2005; Kim BR et al., 2002). Plusieurs autres études ont été menées sur le succès de différentes méthodes d'élimination des bactéries du genre *Legionella* des systèmes de plomberie internes (Stout and Yu, 2003; Chen et al., 2005; Declerck et al., 2007; Zhang and Kuspa, 2009; Lim et al., 2011).

Dans la présente étude, *L. pneumophila* en état planctonique a persisté dans des solutions salines jusqu'à 2% à des températures de 20 et 37 °C. A partir de concentrations plus élevées supérieures à 2 et 3%, on observe une diminution continue de nombre de cellules en fonction du temps. Ces résultats indiquent que *L. pneumophila* peut survivre et persister non seulement dans les systèmes de distribution d'eau, mais aussi dans les eaux marines, car la température de l'eau de mer est environ 20°C, où la concentration de NaCl ne dépasse pas 2 à 3% (Dennis et al., 1981; Dutka, 1984).

À la température 37°C, une relation importante a été observée entre des concentrations en NaCl et le taux de réduction du nombre de cellules. Nous avons remarqué que, plus on augmente la concentration associée à une température relativement élevé (37°C), on constate une diminution importante de nombre de cellules. Bien que *L. pneumophila* a survécu dans de l'eau du robinet stérile à 20 et 37 °C, les meilleurs résultats ont été obtenus à 37 °C. Un résultat également intéressant a été remarqué, c'est que de faibles concentrations de NaCl (0,5%) augmenteraient la survie de *L. pneumophila*. les présents résultats concordent avec les recherches de Barbaree et al. (1983) qui ont montré que *Legionella* était capable de se multiplier dans un bouillon contenant 1 à 1,5% de NaCl. Le rôle spécifique joué par le chlorure de sodium dans le métabolisme de *L. pneumophila* n'a pas été étudié, mais il est bien connu que le sodium est impliqué dans les systèmes de transport métabolique et est également un cofacteur important pour les enzymes.

D'autre part, plusieurs auteurs ont signalé un effet inhibiteur de NaCl sur la croissance et l'isolement de *L. pneumophila* (Feeley et al., 1979; Dennis et al., 1981; Tesh and Miller, 1982; Weiss and Westfall, 1984). De plus, Dutka (1984) a démontré que *L. pneumophila* est plus résistante à l'effet bactéricide combiné de l'eau de mer et de la lumière solaire.

En termes de biofilm, la diminution de nombre de cellules formant le biofilm est faible après traitement par des concentrations inférieures à 2%. Des solutions dépassant 4% ont permis une réduction importante et continue du nombre de cellules formant le biofilm. La persistance du biofilm de 15 jours est nettement plus importante que celle d'un biofilm relativement plus jeune de 6 jours. Ce qui montre

que le vieux biofilm est plus persistant au traitement par rapport au jeune biofilm. Une ré-augmentation de la biomasse de biofilm a été observée les jours après traitement, par des concentrations inférieures à 2%. Par conséquent, *L. pneumophila* aux différents états (libre et en biofilm), est capable de survivre et continue sa croissance après traitement par le NaCl à des concentrations élevées dépassant la teneur en NaCl de l'eau de mer (2.5%). Ce qui prouve la résistance offerte par la formation du biofilm contre les fortes concentrations en chlore et en NaCl.

## V. Conclusion

Des concentrations de NaCl allant jusqu'à 2% n'ont pas d'effets toxiques sur *L. pneumophila*, mais à plus de 2 et 3%, le nombre de cellules a clairement diminué. Alors que de faibles concentrations de 0,5% de NaCl pourraient améliorer la croissance des bactéries. Toutefois, la combinaison de température élevée (37°C) avec des concentrations supérieures à 2-3% en NaCl a montré une réduction importante du nombre de cellules bactériennes.



### ✓ Effet de la salinité sur la survie de *L. pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm

- Un faible taux de réduction des bactéries a été observé pour des concentrations inférieures à 2%.
- Des concentrations salines dépassant 2-3%, ont montré une diminution rapide et importante du nombre de cellules.
- La combinaison d'une température relativement élevée (37 °C) avec des concentrations supérieures à 2-3% a montré une réduction systématique du nombre de cellules bactériennes planctoniques de *L. pneumophila*.
- En termes de biofilm, la diminution du nombre de cellules formant le biofilm est faible après traitement par des concentrations inférieures à 2%.
- Des concentrations dépassant 4% ont permis une réduction importante et continue du nombre de cellules formant le biofilm.
- La persistance du biofilm de 15 jours est nettement plus importante que celle d'un biofilm relativement plus jeune de 6 jours. Ce qui montre que le vieux biofilm est plus persistant au traitement par rapport au jeune biofilm.
- Une ré-augmentation de la biomasse de biofilm a été observée les jours après traitement, par des concentrations inférieures à 2%.

## CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

La légionellose est acquise par inhalation d'aérosols contaminés par la bactérie *Legionella* émis par les sites hydriques artificiels contaminés, principalement les réseaux d'eau chaudes des établissements résidentiels (douches, robinets, spas) et des tours aéroréfrigérantes. *Legionella* est capable d'adhérer aux différentes surfaces, survit en association avec des biofilms bactériens et des amibes libres. Il est estimé que 95% de la biomasse, dans les systèmes d'eau, est localisée à la surface des canalisations sous forme de biofilms.

L'un des nombreux avantages des biofilms pour *Legionella* est sa protection contre les conditions environnementales stressantes. Les biofilms à la surface des tuyaux sont considérés comme la source la plus importante de contamination de l'eau et de risque potentiel pour la santé humaine.

La maîtrise et la connaissance approfondie des différents mécanismes impliqués dans la contamination, la colonisation et la persistance de *Legionella*, dans les systèmes d'eaux chaudes, est donc un objectif prioritaire, qui pourrait apporter des réponses pertinentes aux différentes questions relatives à la gestion du risque de *Legionella* dans les établissements hôteliers. Pour cela, nous avons procédé, dans une première partie, à l'étude bibliographique globale pour mieux connaître les différents aspects relatifs à *Legionella* et son environnement ainsi qu'à l'état des lieux au Maroc. L'analyse bibliographique a, en effet, montré qu'au Maroc comme d'autres pays d'Afrique, la sensibilisation au risque de *Legionella* et les connaissances sur les légionelles ne sont encore qu'à leurs stades initiaux. Ceux-ci suscitent un intérêt grandissant et un redoublement d'effort. Le Maroc comme étant un pays touristique, qui accueille environ 10 millions de touristes chaque année, doit leur assurer un séjour sécurisé sur le plan sanitaire.

C'est dans cette vision que nous avons mené, dans le premier chapitre de cette deuxième partie, une enquête nationale sur la présence de la bactérie *Legionella* dans les établissements hôteliers des principales villes touristiques du royaume. Il s'agit de déterminer la prévalence de cette bactérie et quelques facteurs de risques liés à sa présence dans les réseaux d'eaux chaudes sanitaires. Les résultats de la prévalence ont montré qu'il y a un degré substantiel d'une exposition potentielle à *Legionella* : 4 sur 10 des établissements sujet de l'enquête présentent au minimum un niveau moyen de contamination. La température est le facteur de risque le plus marqué, il est en forte corrélation avec le niveau de contamination et le nombre d'échantillons positifs. Lequel niveau est avéré réductible par l'augmentation de la température.

Le second chapitre s'est penché sur l'étude de la susceptibilité des souches isolées de *L. pneumophila* aux antibiotiques recommandés pour les traitements de la légionellose. Aucune résistance n'a été détectée contre les antibiotiques étudiés. Toutes les souches ont été inhibées par de faibles concentrations d'antibiotiques de la famille des macrolides et fluoroquinolones. La rifampicine est

l'antibiotique le plus actif contre les souches étudiées. A notre connaissance, la présente étude est la première qui s'est intéressé à la susceptibilité aux antibiotiques des souches environnementales isolées à partir des réseaux d'eaux chaudes sanitaires des hôtels au Maroc.

Le troisième chapitre est consacré au typage moléculaire de 20 souches de *L. pneumophila* par trois techniques : le typage phénotypique à l'aide d'anticorps monoclonaux (Mabs), l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et le New-sequencing generation (NGS). Le typage par les anticorps monoclonaux a montré une prévalence de Mab 3/1, avec 8 Camperdown, 7 Oxford et 7 OLDA. La PFGE a détecté 3 différents clones circulant au Maroc, et la NGS a révélé 3 "sequence type" avec une grande prévalence de ST1 suivi par ST560 et 3 nouveaux ST identifiés pour la première fois, dont l'ESGLI a attribué le numéro ST2897. Cette étude représente la première base de données sur les souches de *L. pneumophila* sgl au Maroc, fournissant des données moléculaires et épidémiologiques intéressantes et utiles pour les futures enquêtes épidémiologiques, en particulier les cas de légionellose associée aux voyages.

Le quatrième chapitre de cette partie s'est focalisé sur la détermination des propriétés physicochimiques de la surface bactérienne et la surface des matériaux couramment utilisés dans l'hôtellerie pour la distribution de l'eau chaude. Les résultats obtenus montrent que les bactéries étudiées ont des caractères physicochimiques différents (hydrophobicité, caractère donneur/accepteur d'électrons). Tous les matériaux de plomberie étudiés ont un caractère hydrophobe, donneur d'électron relativement élevé et faiblement accepteur d'électrons, à l'exception du PPR.

Le cinquième et le sixième chapitre sont consacrés à l'étude de l'adhésion et de la formation du biofilm par *L. pneumophila* sur les différents matériaux de la plomberie couramment utilisés pour la distribution de l'eau, et ceci à différentes températures d'incubation. Les résultats obtenus ont montré un grand pouvoir d'adhésion et une forte capacité de formation du biofilm par les souches isolées. La rugosité de la surface des matériaux et leur caractère donneur/accepteur d'électrons présentent une forte corrélation avec l'intensité de l'adhésion. L'acier galvanisé est le matériau le plus colonisé, suivi par le PVC, PEX-c, PPR et l'acier inoxydable. Aucune colonie n'est récupérable à la surface du cuivre, qui semble inhibiteur de la colonisation bactérienne. L'adhésion et la formation du biofilm sont maximales à 37°C, suivi d'un niveau moyen à 45°C et faible à 20°C.

Dans les deux derniers chapitres, nous avons étudié la réponse des souches de *L. pneumophila* à l'état planctonique (cellules libres) et en biofilm au traitement par le chlore et au choc salin par le NaCl. En termes de résultats, *L. pneumophila* à l'état planctonique est capable de persister et survivre à des concentrations résiduelles en chlore similaires à celles recommandées par l'OMS dans les réseaux d'eaux potables (0,2-0,5mg/L). Après traitement par chloration du biofilm à des concentrations allant jusqu'à 200 mg/L, une diminution importante des cellules formant le biofilm a été observée, toutefois, le traitement n'a pas détruit toutes les cellules bactériennes. Ce qui permettrait aux cellules persistantes de reprendre à nouveau la croissance et le développement du biofilm.

Les résultats de l'utilisation du NaCl comme éventuelle approche proposée alternative et moins couteuse pour tuer *Legionella*, ont montré que cette bactérie, à l'état libre ou en biofilms, est capable de survie et continue sa croissance après traitement par le NaCl à des concentrations élevées dépassant la teneur en NaCl de l'eau de mer (2.5%). Ce qui prouve la résistance offerte par la formation du biofilm contre les fortes concentrations en chlore et en NaCl.

Cette étude réalisée au niveau des établissements hôteliers du Maroc, pour déterminer les éléments d'analyse du risque des légionelles dans les réseaux d'eaux chaudes sanitaires, montre que ces bactéries sont bien présentes dans ces établissements, ce qui constitue un vrai danger, si aucune mesure n'est prise, en termes de surveillance et de contrôle des installations de production des eaux chaudes sanitaire, dans le cadre d'un système efficace de gestion des risques de légionelles.

Ce travail ouvre la voie à la réalisation d'autres investigations pour mieux cerner la problématique, non seulement dans les hôtels, mais aussi dans les différents établissements recevant du public au Maroc, et à la recherche des moyens de lutte innovantes et applicables contre ce pathogène :

- Elargir le champ d'étude et réaliser des enquêtes d'investigation au niveau d'autres villes du Maroc et établissements recevant du public au Maroc à savoir les Hôpitaux, les Hammams, les salles de sport, les cités universitaires, les résidences domestiques et les centres d'accueil des personnes âgées.
- Etudier l'interaction entre *Legionella* et les amibes libres pour mieux comprendre les mécanismes d'interaction et de coexistence dans la mesure d'instaurer de nouvelles procédures de lutte contre les amibes, et par conséquent, *Legionella*.
- Evaluer l'effet des moyens de lutte (chlore, NaCl...) contre le biofilm de *L. pneumophila* à différents stades de développement.
- Etudier les gènes de virulences impliqués dans les mécanismes de formation du biofilm et la virulence de la bactérie.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDEL-NOUR, M., DUNCAN, C., LOW, D. E. & GUYARD, C. 2013. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 21660-75.
- AL-MATAWAH, Q. A., AL-ZENKI, S. F., QASEM, J. A., AL-WAALAN, T. E. & BEN HEJI, A. H. 2012. Detection and Quantification of *Legionella pneumophila* from Water Systems in Kuwait Residential Facilities. *J Pathog*, 2012, 138389.
- ALARY, M. & JOLY, J. R. 1991. Risk factors for contamination of domestic hot water systems by legionellae. *Appl Environ Microbiol*, 57, 2360-7.
- ALEXANDROPOULOU, I. G., NTOUGIAS, S., KONSTANTINIDIS, T. G., PARASIDIS, T. A., PANOPOULOU, M. & KONSTANTINIDIS, T. C. 2015. Environmental surveillance and molecular epidemiology of waterborne pathogen *Legionella pneumophila* in health-care facilities of Northeastern Greece: a 4-year survey. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 22, 7628-40.
- ALEXANDROPOULOU, I. G., PARASIDIS, T. A., KONSTANTINIDIS, T. G., KONSTANTINIDIS, T. C. & PANOPOULOU, M. 2013. Antibiotic susceptibility surveillance of environmental *Legionella* strains: application of the E-test to bacteria isolated from hospitals in Greece. *J. Infect. Dis. Ther.*, 1, e103.
- ALLERON, L., MERLET, N., LACOMBE, C. & FRERE, J. 2008. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol*, 57, 497-502.
- ALLI, O. T., GAO, L.-Y., PEDERSEN, L. L., ZINK, S., RADULIC, M., DORIC, M. & KWAİK, Y. A. 2000. Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*, 68, 6431-40.
- ALMAHMOUD, I., KAY, E., SCHNEIDER, D. & MAURIN, M. 2009. Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 64, 284-93.
- AMEMURA-MAEKAWA, J., KIKUKAWA, K., HELBIG, J. H., KANEKO, S., SUZUKI-HASHIMOTO, A., FURUHATA, K., CHANG, B., MURAI, M., ICHINOSE, M., OHNISHI, M., KURA, F. & WORKING GROUP FOR LEGIONELLA IN, J. 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol*, 78, 4263-70.
- AMORY, D., GENET, M. & ROUXHET, P. 1988a. Application of XPS to the surface analysis of yeast cells. *Surface and interface analysis*, 11, 478-86.
- AMORY, D., MOZES, N., HERMESSE, M., LEONARD, A. & ROUXHET, P. 1988b. Chemical analysis of the surface of microorganisms by X-ray photoelectron spectroscopy. *FEMS microbiology letters*, 49, 107-10.
- ARSLAN-AYDOĞDU, E. Ö. & KIMIRAN, A. 2018. An investigation of virulence factors of *Legionella pneumophila* environmental isolates. *brazilian journal of microbiology*, 49, 189-99.
- ARVAND, M., JUNGKIND, K. & HACK, A. 2011. Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: do we know the true dimension? *Euro Surveill*, 16.
- ATLAS, R. M. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology*, 1, 283-93.
- AURELL, H., ETIENNE, J., FOREY, F., REYROLLE, M., GIRARDO, P., FARGE, P., DECLUDT, B., CAMPESE, C., VANDENESCH, F. & JARRAUD, S. 2003. *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *Journal of clinical microbiology*, 41, 3320-2.
- BAGH, L. K., ALBRECHTSEN, H. J., ARVIN, E. & OVESEN, K. 2004. Distribution of bacteria in a domestic hot water system in a Danish apartment building. *Water research*, 38, 225-35.
- BALLARD, A. L., FRY, N. K., CHAN, L., SURMAN, S. B., LEE, J. V., HARRISON, T. G. & TOWNER, K. J. 2000. Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *J Clin Microbiol*, 38, 4215-8.



- BARBAREE, J. M., SANCHEZ, A. & SANDEN, G. N. 1983. Tolerance of *Legionella* species to sodium chloride. *Current Microbiology*, 9, 1-5.
- BARKER, J. & BLOOMFIELD, S. 2000. Survival of *Salmonella* in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 137-44.
- BARKER, J., BROWN, M., COLLIER, P. J., FARRELL, I. & GILBERT, P. 1992. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Applied and environmental microbiology*, 58, 2420-5.
- BARKER, J., LAMBERT, P. & BROWN, M. 1993. Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*, 61, 3503-10.
- BARKER, J., SCAIFE, H. & BROWN, M. 1995. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39, 2684-8.
- BARNA, Z., KADAR, M., KALMAN, E., SCHEIRICH SZAX, A. & VARGHA, M. 2016. Prevalence of *Legionella* in premise plumbing in Hungary. *Water Res*, 90, 71-8.
- BARON, P. A. & WILLEKE, K. 1986. Respirable droplets from whirlpools: measurements of size distribution and estimation of disease potential. *Environmental research*, 39, 8-18.
- BARRABEIG, I., ROVIRA, A., GARCIA, M., OLIVA, J., VILAMALA, A., FERRER, M., SABRIÀ, M. & DOMÍNGUEZ, A. 2010. Outbreak of Legionnaires' disease associated with a supermarket mist machine. *Epidemiology and infection*, 138, 1823-8.
- BARTRAM, J. 2007. *Legionella and the prevention of legionellosis*, World Health Organization.
- BATTÉ, M., APPENZELLER, B., GRANDJEAN, D., FASS, S., GAUTHIER, V., JORAND, F., MATHIEU, L., BOUALAM, M., SABY, S. & BLOCK, J. 2003. Biofilms in drinking water distribution systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2, 147-68.
- BAYOUDH, S., OTHMANE, A., BETTAIEB, F., BAKHROUF, A., OUADA, H. B. & PONSONNET, L. 2006. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering: C*, 26, 300-5.
- BEAUTÉ, J. 2017. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Eurosurveillance*, 22.
- BEAUTE, J., ZUCS, P., DE JONG, B. & EUROPEAN LEGIONNAIRES' DISEASE SURVEILLANCE, N. 2013. Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. *Euro Surveill*, 18, 20417.
- 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.
- BELLON-FONTAINE, M.-N., RAULT, J. & VAN OSS, C. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7, 47-53.
- BENGOURRAM, J., HAMADI, F., MABROUKI, M., KOUIDER, N., ZEKRAOUI, M., ELLOUALI, M. & LATRACHE, H. 2009. Relationship between roughness and physicochemical properties of glass surface and theoretical adhesion of bacterial cells. *Physical & chemical news*, 138-44.
- BENHAMOU, D., BRU, J., CHIDIAC, C., ETIENNE, J., LÉOPHONTE, P., MARTY, N., POIRIER, R., ROUQUET, R. & FRANÇAISE, S. D. P. I. D. L. 2005. Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment. *Médecine et maladies infectieuses*, 35, 1.
- BENSON, R. F. & FIELDS, B. S. Classification of the genus *Legionella*. *Seminars in respiratory infections*, 1998. 90-9.
- BERGER, K. H. & ISBERG, R. R. 1993. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Molecular microbiology*, 7, 7-19.
- BERK, S. G., GUNDERSON, J. H., NEWSOME, A. L., FARONE, A. L., HAYES, B. J., REDDING, K. S., UDDIN, N., WILLIAMS, E. L., JOHNSON, R. A., FARSIAN, M., REID, A., SKIMMYHORN, J. & FARONE, M. B. 2006. Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ Sci Technol*, 40, 7440-4.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 279-86.

- BERRY, D., XI, C. & RASKIN, L. 2006. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current opinion in biotechnology*, 17, 297-302.
- BESSER, J., CARLETON, H. A., GERNER-SMIDT, P., LINDSEY, R. L. & TREES, E. 2018. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24, 335-41.
- BITAR, D. M., MOLMERET, M. & KWAİK, Y. A. 2004. Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 293, 519-27.
- BLAZQUEZ GARRIDO, R. M., ESPINOSA PARRA, F. J., ALEMANY FRANCES, L., RAMOS GUEVARA, R. M., SANCHEZ-NIETO, J. M., SEGOVIA HERNANDEZ, M., SERRANO MARTINEZ, J. A. & HUERTA, F. H. 2005. Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: levofloxacin versus macrolides. *Clin. Infect. Dis.*, 40, 800-6.
- BODET, C., SAHR, T., DUPUY, M., BUCHRIESER, C. & HECHARD, Y. 2012. *Legionella pneumophila* transcriptional response to chlorine treatment. *Water Res*, 46, 808-16.
- BOER, J. D., YZERMAN, E. P., SCHELLEKENS, J., LETTINGA, K. D., BOSHIJZEN, H. C., STEENBERGEN, J., BOSMAN, A., HOF, S., VLIET, H. & PEETERS, M. F. 2002. A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerging infectious diseases*, 8, 37-43.
- BOHINC, K., DRAŽIĆ, G., ABRAM, A., JEVŠNIK, M., JERŠEK, B., NIPIC, D., KURINČIČ, M. & RASPOR, P. 2016. Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 68, 39-46.
- BOHINC, K., DRAŽIĆ, G., ODER, M., JEVŠNIK, M., NIPIC, D., GODIČ-TORKAR, K. & RASPOR, P. 2014. Available surface dictates microbial adhesion capacity. *International journal of adhesion and adhesives*, 50, 265-72.
- BOONAERT, C. J. & ROUXHET, P. G. 2000. Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Applied and environmental microbiology*, 66, 2548-54.
- BORCHARDT, J., HELBIG, J. H. & LUCK, P. C. 2008. Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 27, 29-36.
- BORELLA P, GUERRIERI E, MARCHESI I, BONDI M & P., M. 2005. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review*, 11, 355-80.
- BORELLA, P., GUERRIERI, E., MARCHESI, I., BONDI, M. & MESSI, P. 2005a. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 355-80.
- BORELLA, P., MONTAGNA, M. T., ROMANO-SPICA, V., STAMPI, S., STANCANELLI, G., TRIASSI, M., NEGLIA, R., MARCHESI, I., FANTUZZI, G., TATO, D., NAPOLI, C., QUARANTA, G., LAURENTI, P., LEONI, E., DE LUCA, G., OSSI, C., MORO, M. & RIBERA D'ALCALA, G. 2004. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis*, 10, 457-64.
- BORELLA, P., MONTAGNA, M. T., 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. 2005b. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol*, 71, 5805-13.
- BORNSTEIN, N., VIEILLY, C., NOWICKI, M., PAUCOD, J. C. & FLEURETTE, J. 1986. Epidemiological evidence of legionellosis transmission through domestic hot water supply systems and possibilities of control. *Isr J Med Sci*, 22, 655-61.
- BOS, R., VAN DER MEI, H. C. & BUSSCHER, H. J. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. *FEMS microbiology reviews*, 23, 179-230.
- BOULANGER, C. A. & EDELSTEIN, P. H. 1995. Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol*, 61, 1805-9.

- BOUTALEB, N., LATRACHE, H. & SIRE, O. 2008. Bacteria-materials interactions in drinking water pipes. Roles of the environment on the physico-chemical properties of the cell surface. *TSM. science methods Techniques* 11, 73-80.
- BOUYER, S., IMBERT, C., RODIER, M. H. & HÉCHARD, Y. 2007. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environmental microbiology*, 9, 1341-4.
- BOZUE, J. A. & JOHNSON, W. 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infection and immunity*, 64, 668-73.
- BRADY, M. F. & SUNDARESHAN, V. 2019. Legionnaires' Disease (*Legionella* Infection). *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- BRENNER, D. J., STEIGERWALT, A. G. & MCDADE, J. E. 1979. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Annals of Internal Medicine*, 90, 656-8.
- BRIANDET, R., MEYLHEUC, T., MAHER, C. & BELLON-FONTAINE, M. N. 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and environmental microbiology*, 65, 5328-33.
- BRIELAND, J., MCCLAIN, M., LEGENDRE, M. & ENGLEBERG, C. 1997a. Intrapulmonary *Hartmannella vermiformis*: a potential niche for *Legionella pneumophila* replication in a murine model of legionellosis. *Infection and immunity*, 65, 4892-6.
- BRIELAND, J. K., FANTONE, J. C., REMICK, D. G., LEGENDRE, M., MCCLAIN, M. & ENGLEBERG, N. C. 1997b. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infection and immunity*, 65, 5330-3.
- BRUIN, J. P., IJZERMAN, E. P., DENBOER, J. W., MOUTON, J. W. & DIEDEREN, B. M. 2012. Wild-type IJZ distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 72, 103-8.
- BUCHBINDER, S., TREBESIUS, K. & HEESEMANN, J. 2002. Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. *Int J Med Microbiol*, 292, 241-5.
- BUCKINGHAM-MEYER, K., GOERES, D. M. & HAMILTON, M. A. 2007. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *Journal of microbiological methods*, 70, 236-44.
- BULLETIN INH 2017. Bulletin de l'Institut National d'Hygiène, édition semestrielle. *Institut National d'Hygiène*, 8, 1-8.
- BURNSSED, L. J., HICKS, L. A., SMITHEE, L. M., FIELDS, B. S., BRADLEY, K. K., PASCOE, N., RICHARDS, S. M., MALLONEE, S., LITRELL, L. & BENSON, R. F. 2007. A large, travel-associated outbreak of legionellosis among hotel guests: utility of the urine antigen assay in confirming Pontiac fever. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 222-8.
- BUSE, H. Y., JI, P., GOMEZ-ALVAREZ, V., PRUDEN, A., EDWARDS, M. A. & ASHBOLT, N. J. 2017. Effect of temperature and colonization of *Legionella pneumophila* and *Vermamoeba vermiformis* on bacterial community composition of copper drinking water biofilms. *Microb Biotechnol*.
- BUSE, H. Y., SCHOEN, M. E. & ASHBOLT, N. J. 2012. Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. *Water Res*, 46, 921-33.
- BUSSCHER, H. J., WEERKAMP, A. H., VAN DER MEI, H. C., VAN PELT, A., DE JONG, H. P. & ARENDS, J. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 980-3.
- BYRNE, B. & SWANSON, M. S. 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infection and immunity*, 66, 3029-34.
- CAMPESE, C., BITAR, D., JARRAUD, S., MAINE, C., FOREY, F., ETIENNE, J., DESENCLOS, J. C., SAURA, C. & CHE, D. 2011a. Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France, 1998-2008. *Int J Infect Dis*, 15, e30-7.
- CAMPESE, C., DESCOURS, G., LEPOUTRE, A., BERAUD, L., MAINE, C., CHE, D. & JARRAUD, S. 2015. Legionnaires' disease in France. *Med Mal Infect*, 45, 65-71.

- CAMPESE, C., JARRAUD, S., MAINE, C. & CHE, D. 2011b. La légionellose en France : augmentation du nombre de cas en 2010. *Bull Epidemiol Hebd*, 325-7, 29-30.
- CAMPOS, C., LORET, J., COOPER, A. & KELLY, R. 2003. Disinfection of domestic water systems for *Legionella pneumophila*. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, 52, 341-54.
- CASSELL, K., GACEK, P., RABATSKY-EHR, T., PETIT, S., CARTTER, M. & WEINBERGER, D. M. 2019. Estimating the True Burden of Legionnaires' Disease. *American Journal of Epidemiology*.
- CATEAU, E., DELAFONT, V., HECHARD, Y. & RODIER, M. 2014. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *Journal of Hospital Infection*, 87, 131-40.
- CAZALET, C., JARRAUD, S., GHAVI-HELM, Y., KUNST, F., GLASER, P., ETIENNE, J. & BUCHRIESER, C. 2008. Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome research*, 18, 431-41.
- CDC 2016. Surveillance passive de légionellose durant la période 2000-2014 <https://www.cdc.gov/legionella/surv-reporting.html>. *Centers for Disease Control and Prevention*, 20/05/2017.
- CHAMBERLAIN, A. & JOHAL, S. 1988. Biofilms on meat processing surfaces. *Biodeterioration* 7. Springer.
- CHANDLER, F. W., BLACKMON, J. A., HICKLIN, M. D., COLE, R. M. & CALLAWAY, C. S. 1979. Ultrastructure of the agent of Legionnaires' disease in the human lung. *American journal of clinical pathology*, 71, 43-50.
- CHAO, Y. & ZHANG, T. 2011. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Applied microbiology and biotechnology*, 92, 381-92.
- CHASQUEIRA, M. J., RODRIGUES, L., NASCIMENTO, M. & MARQUES, T. 2009. Sequence-based and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* isolated from patients in Portugal during 1987-2008. *Euro Surveill*, 14.
- CHATTERJEE, S., BISWAS, N., DATTA, A., DEY, R. & MAITI, P. 2014. Atomic force microscopy in biofilm study. *Microscopy*, 63, 269-78.
- CHEN, Y. S., LIU, Y. C., LEE, S. S., TSAI, H. C., WANN, S. R., KAO, C. H., CHANG, C. L., HUANG, W. K., HUANG, T. S., CHAO, H. L., LI, C. H., KE, C. M. & LIN, Y. S. 2005. Abbreviated duration of superheat-and-flush and disinfection of taps for *Legionella* disinfection: lessons learned from failure. *Am J Infect Control*, 33, 606-10.
- CHRISTIE, P. J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular microbiology*, 40, 294-305.
- CHRISTIE, P. J. & VOGEL, J. P. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in microbiology*, 8, 354-60.
- CIANCIOOTTO, N. P. 2001. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 291, 331-43.
- CIESIELSKI, C. A., BLASER, M. J. & WANG, W. 1986. Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infection and immunity*, 51, 397-404.
- 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*. *Infection and immunity*, 67, 4427-34.
- CIRILLO, J. D., FALKOW, S. & TOMPKINS, L. S. 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and Immunity*, 62, 3254-61.
- CLEMENTS, A., GABORIAUD, F., DUVAL, J. F., FARN, J. L., JENNEY, A. W., LITHGOW, T., WIJBURG, O. L., HARTLAND, E. L. & STRUGNELL, R. A. 2008. The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association. *PLoS One*, 3, e3817.
- COERS, J., MONAHAN, C. & ROY, C. R. 1999. Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol*, 1, 451-3.

- COIL, D. A. & ANNÉ, J. 2009. Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS microbiology letters*, 293, 271-7.
- COOPER, I. & HANLON, G. 2010a. Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *Journal of Hospital Infection*, 74, 152-9.
- COOPER, I. R. & HANLON, G. W. 2010b. Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *The Journal of hospital infection* 74, 152-9.
- CORPE, W. 1980. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. *Adsorption of microorganisms to surfaces*. New York: John Wiley & Sons, 105-44.
- CORREIA, A. M., FERREIRA, J. S., BORGES, V., NUNES, A., GOMES, B., CAPUCHO, R., GONCALVES, J., ANTUNES, D. M., ALMEIDA, S., MENDES, A., GUERREIRO, M., SAMPAIO, D. A., VIEIRA, L., MACHADO, J., SIMOES, M. J., GONCALVES, P. & GOMES, J. P. 2016. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N. Engl. J. Med.*, 374, 497-8.
- COSCOLLA, M., FENOLLAR, J., ESCRIBANO, I. & GONZALEZ-CANDELAS, F. 2010. Legionellosis outbreak associated with asphalt paving machine, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis*, 16, 1381-7.
- COSTERTON, J. W. 1999. Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11, 217-21.
- COWAN, M., VAN DER MEI, H., ROUXHET, P. & BUSSCHER, H. 1992. Physico-chemical and structural properties of the surfaces of *Peptostreptococcus micros* and *Streptococcus mitis* as compared to those of *mutans streptococci*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius*. *Microbiology*, 138, 2707-14.
- CRAUN, G. F., BRUNKARD, J. M., YODER, J. S., ROBERTS, V. A., CARPENTER, J., WADE, T., CALDERON, R. L., ROBERTS, J. M., BEACH, M. J. & ROY, S. L. 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clin Microbiol Rev*, 23, 507-28.
- CSHPF 2005. Le risque lié aux légionelles Guide d'investigation et d'aide à la gestion. *Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France*.
- CUPERUS, P. L., VAN DER MEI, H. C., REID, G., BRUCE, A. W., KHOURY, A. H., ROUXHET, P. G. & BUSSCHER, H. J. 1993. Physicochemical surface characteristics of urogenital and poultry lactobacilli. *Journal of colloid and interface science*, 156, 319-24.
- D'COSTA, V. M., MCGRANN, K. M., HUGHES, D. W. & WRIGHT, G. D. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311, 374-7.
- DALTON, H. M. & MARCH, P. E. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 252-5.
- DAVEY, M. E. & O'TOOLE, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64, 847-67.
- DE BUCK, E., ANNE, J. & LAMMERTYN, E. 2007. The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology*, 153, 3948-53.
- DE GIGLIO, O., NAPOLI, C., APOLLONIO, F., BRIGIDA, S., MARZELLA, A., DIELLA, G., CALIA, C., SCRASCIA, M., PACIFICO, C., PAZZANI, C., URICCHIO, V. F. & MONTAGNA, M. T. 2019. Occurrence of *Legionella* in groundwater used for sprinkler irrigation in Southern Italy. *Environ Res*, 170, 215-21.
- DE GIGLIO, O., NAPOLI, C., LOVERO, G., DIELLA, G., RUTIGLIANO, S., CAGGIANO, G. & MONTAGNA, M. T. 2015. Antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water systems in Southern Italy. *Environ. Res.*, 142, 586-90.
- DEBORDE, M. & VON GUNTEN, U. 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—kinetics and mechanisms: a critical review. *Water research*, 42, 13-51.
- DECLERCK, P., BEHETS, J., MARGINEANU, A., VAN HOEF, V., DE KEERSMAECKER, B. & OLLEVIER, F. 2007. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiological research*, 164, 593-603.
- DECLERCK, P., BEHETS, J., MARGINEANU, A., VAN HOEF, V., DE KEERSMAECKER, B. & OLLEVIER, F. 2009. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.*, 164, 593-603.

- DELGADO-VISCOGLIOSI, P., SOLIGNAC, L. & DELATTRE, J. M. 2009. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Appl Environ Microbiol*, 75, 3502-12.
- DEN BOER, J. W., FRIESEMA, I. H. & HOOI, J. D. 2002. [Reported cases of *Legionella* pneumonia in the Netherlands, 1987-2000]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 146, 315-20.
- DENGIS, P. B. & ROUXHET, P. G. 1997. Surface properties of top-and bottom-fermenting yeast. *Yeast*, 13, 931-43.
- DENNIS, P. J., TAYLOR, J. A. & BARROW, G. I. 1981. Phosphate buffered, low sodium chloride blood agar medium for *Legionella pneumophila*. *Lancet*, 2, 636.
- DGS 2013. Instruction DGS/EA4 no 2013-34 du 30 janvier 2013 relative au référentiel d'inspection-contrôle de la gestion des risques liés aux légionnelles dans les installations d'eau des bâtiments. *Direction générale de la santé*.
- DIEDEREN, B. 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection*, 56, 1-12.
- DIEDEREN, B. M., DE JONG, C. M., AARTS, I., PEETERS, M. F. & VAN DER ZEE, A. 2007. Molecular evidence for the ubiquitous presence of *Legionella* species in Dutch tap water installations. *J Water Health*, 5, 375-83.
- DIETRICH, C., HEUNER, K., BRAND, B. C., HACKER, J. & STEINERT, M. 2001. Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infection and immunity*, 69, 2116-22.
- DIMITRIADI, D. & VELONAKIS, E. 2014. Detection of *Legionella* spp. from Domestic Water in the Prefecture of Arta, Greece. *J Pathog*, 2014, 407385.
- DJERIBI, R., BOUCHERIT, Z., BOUCHLOUKH, W., ZOUAOU, W., LATRACHE, H., HAMADI, F. & MENAA, B. 2013. A study of pH effects on the bacterial surface physicochemical properties of *Acinetobacter baumannii*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 540-5.
- DONLAN, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases journal* 8, 881-90.
- DOWLING, J. N., SAHA, A. & GLEW, R. 1992. Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiological reviews*, 56, 32-60.
- DRUETT, H., HENDERSON, D., PACKMAN, L. & PEACOCK, S. 1953. Studies on respiratory infection: I. The influence of particle size on respiratory infection with anthrax spores. *Journal of Hygiene*, 51, 359-71.
- DUFRÊNE, Y. F., VAN DER WAL, A., NORDE, W. & ROUXHET, P. G. 1997. X-ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of gram-positive bacteria: comparison with biochemical analysis. *Journal of bacteriology*, 179, 1023-8.
- DUNNE, W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, 15, 155-66.
- DUTKA, B. J. 1984. Sensitivity of *Legionella pneumophila* to sunlight in fresh and marine waters. *Appl Environ Microbiol*, 48, 970-4.
- DUVAL, J. F. & GABORIAUD, F. 2010. Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 184-95.
- EBOIGBODIN, K. E., SETH, A. & BIGGS, C. A. 2008. A review of biofilms in domestic plumbing. *Journal - American Water Works Association*, 100, 131-8.
- ECDC 2018. Legionnaires' disease. . In *ECDC: Annual Epidemiological Report for 2016*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention.
- EDELSTEIN, P. H. & CIANCOTTO, N. P. 2006. *Legionella* species and Legionnaires' disease. *The Prokaryotes*. Springer.
- ELGHMARI, A., LATRACHE, H., HAMADI, F., EL, M. L., EL, A. B., HAKKOU, A. & BOURLIOUX, P. 2002. Influence of surface cell structures on physicochemical properties of *Escherichia coli*. *The new microbiologica*, 25, 173-8.
- ERDOGAN, H. & ARSLAN, H. 2007. Colonization of *Legionella* species in hotel water systems in Turkey. *J Travel Med*, 14, 369-73.
- ERDOGAN, H. & ARSLAN, H. 2015. Colonization of *Legionella* species in Turkish baths in hotels in Alanya, Turkey. *Environ Monit Assess*, 187, 235.

- ERDOGAN, H., CAN, F., DEMIRBILEK, M., TIMURKAYNAK, F. & ARSLAN, H. 2010. In vitro activity of antimicrobial agents against *Legionella* isolated from environmental water systems: first results from Turkey. *Environ. Monit. Assess.*, 171, 487-91.
- EWANN, F. & HOFFMAN, P. S. 2006. Cysteine metabolism in *Legionella pneumophila*: characterization of an L-cystine-utilizing mutant. *Applied and environmental microbiology*, 72, 3993-4000.
- FAULKNER, G. & GARDUNO, R. A. 2002. Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 184, 7025-41.
- FAULKNER, G. & GARDUÑO, R. A. 2002. Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology*, 184, 7025-41.
- 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*. *Journal of clinical microbiology*, 10, 437-41.
- FELICE, A., FRANCHI, M., DE MARTIN, S., VITACOLONNA, N., IACUMIN, L. & CIVILINI, M. 2019. Environmental surveillance and spatio-temporal analysis of *Legionella* spp. in a region of northeastern Italy (2002-2017). *PLoS One*, 14, e0218687.
- FERNANDEZ-MOREIRA, E., HELBIG, J. H. & SWANSON, M. S. 2006. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect Immun*, 74, 3285-95.
- FIELDS, B. S. 1996. The molecular ecology of legionellae. *Trends in microbiology*, 4, 286-90.
- FIELDS, B. S., BENSON, R. F. & BESSER, R. E. 2002a. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 506-26.
- FIELDS, B. S., BENSON, R. F. & BESSER, R. E. 2002b. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews*, 15, 506-26.
- FLANDERS, W. D., KIRKLAND, K. H. & SHELTON, B. G. 2014. Effects of holding time and measurement error on culturing *Legionella* in environmental water samples. *Water research*, 62, 293-301.
- FLEMMING, H.-C., PERCIVAL, S. L. & WALKER, J. T. 2002. Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Science and Technology*, 2, 27-280.
- FLIERMANS, C., CHERRY, W., ORRISON, L., SMITH, S., TISON, D. & POPE, D. 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 9-16.
- FONTANA, S., SCATURRO, M., ROTA, M. C., CAPORALI, M. G. & RICCI, M. L. 2014. Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical strains isolated in Italy. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 597-602.
- FRANCO, I. S., SHUMAN, H. A. & CHARPENTIER, X. 2009. The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cellular microbiology*, 11, 1435-43.
- FRASER, D. W. 2005. The challenges were legion. *The Lancet infectious diseases*, 5, 237-41.
- FRASER, D. W., TSAI, T. R., ORENSTEIN, W., PARKIN, W. E., BEECHAM, H. J., SHARRAR, R. G., HARRIS, J., MALLISON, G. F., MARTIN, S. M. & MCDADE, J. E. 1977. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 297, 1189-97.
- FRY, N. K., BANGSBORG, J. M., BERGMANS, A., BERNANDER, S., ETIENNE, J., FRANZIN, L., GAIA, V., HASENBERGER, P., BALADRON JIMENEZ, B., JONAS, D., LINDSAY, D., MENTULA, S., PAPOUTSI, A., STRUELENS, M., ULDUM, S. A., VISCA, P., WANNET, W. & HARRISON, T. G. 2002. Designation of the European Working Group on Legionella Infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing Using a standard protocol. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 21, 722-8.
- FRY, N. K., BANGSBORG, J. M., BERNANDER, S., ETIENNE, J., FORSBLOM, B., GAIA, V., HASENBERGER, P., LINDSAY, D., PAPOUTSI, A., PELAZ, C., STRUELENS, M., ULDUM, S. A., VISCA, P. & HARRISON, T. G. 2000. Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19, 773-80.

- FURUHATA, K., ISHIZAKI, N., UMEKAWA, N., NISHIZIMA, M. & FUKUYAMA, M. 2014. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) pattern analysis and chlorine-resistance of *Legionella pneumophila* isolated from hot spring water samples. *Biocontrol Sci*, 19, 33-8.
- GABAY, J., BLAKE, M., NILES, W. & HORWITZ, M. 1985. Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *Journal of bacteriology*, 162, 85-91.
- GAGNON, G., RAND, J., O'LEARY, K., RYSEL, A., CHAURET, C. & ANDREWS, R. 2005. Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water research*, 39, 1809-17.
- GAIA, V., FRY, N. K., AFSHAR, B., LUCK, P. C., MEUGNIER, H., ETIENNE, J., PEDUZZI, R. & HARRISON, T. G. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*, 43, 2047-52.
- GAIA, V., FRY, N. K., HARRISON, T. G. & PEDUZZI, R. 2003. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J Clin Microbiol*, 41, 2932-9.
- GALLARDO-MORENO, A., GONZÁLEZ-MARTÍN, M., PEREZ-GIRALDO, C., BRUQUE, J. & GOMEZ-GARCIA, A. 2004. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. *Journal of colloid and interface science*, 271, 351-8.
- GALLARDO-MORENO, A. M., GONZÁLEZ-MARTÍN, M. L., PÉREZ-GIRALDO, C., GARDUÑO, E., BRUQUE, J. M. & GÓMEZ-GARCÍA, A. C. 2002. Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. *Applied and environmental microbiology*, 68, 2610-3.
- GAO, L.-Y., HARB, O. S. & KWAİK, Y. A. 1997. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infection and immunity*, 65, 4738-46.
- GAO, L.-Y. & KWAİK, Y. A. 1999. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infection and immunity*, 67, 862-70.
- GAO, L. Y. & ABU KWAİK, Y. 2000. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environmental microbiology*, 2, 79-90.
- GARCIA, M. T., JONES, S., PELAZ, C., MILLAR, R. D. & ABU KWAİK, Y. 2007. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ. Microbiol.*, 9, 1267-77.
- GARCIA, M. T., PELAZ, C., GIMENEZ, M. J. & AGUILAR, L. 2000. In vitro activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test results. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 2176-8.
- GARDUÑO, R. A., GARDUÑO, E., HILTZ, M. & HOFFMAN, P. S. 2002. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and immunity*, 70, 6273-83.
- GARDUÑO, R. A., GARDUÑO, E. & HOFFMAN, P. S. 1998a. Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infection and immunity*, 66, 4602-10.
- GARRETT, T. R., BHAKOO, M. & ZHANG, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18, 1049-56.
- GARRIGUES, M.-L. & VERON, M. Apport de la chromatographie gaz-liquide au diagnostic microbiologique. *Annales de biologie clinique*, 1987. John Libbey Eurotext, 135-43.
- GIÃO, M. S., WILKS, S. A., AZEVEDO, N. F., VIEIRA, M. J. & KEEVIL, C. W. 2009. Comparison between standard cultures and peptide nucleic acid 16S rRNA hybridization quantification to study the influence of physico-chemical parameters on *Legionella pneumophila* survival in drinking water biofilms. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 25, 335-43.
- GIAO, M. S., WILKS, S. A. & KEEVIL, C. W. 2015. Influence of copper surfaces on biofilm formation by *Legionella pneumophila* in potable water. *Biomaterials*, 28, 329-39.



- GINEVRA, C., LOPEZ, M., FOREY, F., REYROLLE, M., MEUGNIER, H., VANDENESCH, F., ETIENNE, J., JARRAUD, S. & MOLMERET, M. 2009. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol*, 47, 981-7.
- GLICK, T. H., GREGG, M. B., BERMAN, B., MALLISON, G., RHODES, W. W. & KASSANOFF, I. 1978. Pontiac fever an epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology*, 107, 149-60.
- GOLDBERG, J. 2002. Biofilms and antibiotic resistance: a genetic linkage. *TRENDS in Microbiology*, 10, 264.
- GOLDSTONE, R. J., POPAT, R., FLETCHER, M. P., CRUSZ, S. A., DIGGLE, S. P., LEAR, G. & LEWIS, G. 2012. Quorum sensing and social interactions in microbial biofilms. *Microbial biofilms: Current research and applications*, 1-24.
- GOMEZ-LUS, R., ADRIAN, F., DEL CAMPO, R., GOMEZ-LUS, P., SANCHEZ, S., GARCIA, C. & RUBIO, M. C. 2001. Comparative in vitro bacteriostatic and bactericidal activity of trovafloxacin, levofloxacin and moxifloxacin against clinical and environmental isolates of *Legionella* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 18, 49-54.
- GOMEZ-VALERO, L., RUSNIOK, C. & BUCHRIESER, C. 2009. *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. *Infect Genet Evol*, 9, 727-39.
- GRARE, M., DAGUE, E., MOURER, M., REGNOUF-DE-VAINS, J.-B., FINANCE, C., DUVAL, J.-F., DUVAL, R.-E. & GABORIAUD, F. 2007. Microélectrophorèse et microscopie à force atomique: deux nouveaux outils d'évaluation de l'effet pariétal d'antibactériens. *Pathologie Biologie*, 55, 465-71.
- GREEN, H. L. & LANE, W. R. 1964. Particulate clouds: dusts, smokes and mists. Their physics and physical chemistry and industrial and environmental aspects. *Particulate clouds: dusts, smokes and mists*. .
- GREENBERG, D., CHIOU, C. C., FAMIGILLETI, R., LEE, T. C. & YU, V. L. 2006. Problem pathogens: paediatric legionellosis--implications for improved diagnosis. *Lancet Infect Dis*, 6, 529-35.
- GREUB, G. & RAOULT, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews*, 17, 413-33.
- GRIMM, D., MERKERT, H., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H., HACKER, J. & BRAND, B. C. 1998. Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol*, 64, 2686-90.
- GUO, J., LIANG, T., HU, C., LV, R., YANG, X., CUI, Y., SONG, Y., YANG, R., ZHU, Q. & SONG, Y. 2015. Sequence types diversity of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water sources in Guangzhou and Jiangmen, China. *Infect Genet Evol*, 29, 35-41.
- GUYARD, C. & LOW, D. E. 2011. *Legionella* infections and travel associated legionellosis. *Travel Med. Infect. Di.*, 9, 176-86.
- HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. & STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95-108.
- HAMADI, F., ASSERNE, F., ELABED, S., BENSOUDA, S., MABROUKI, M. & LATRACHE, H. 2014. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control*, 38, 104-8.
- HAMADI, F. & LATRACHE, H. 2008. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor–electron acceptor (acid–base) properties of bacterial surface. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 65, 134-9.
- HAMADI, F., LATRACHE, H., MLJI, E., MALLOUKI, B., MABROUKI, M. & ELLOUALI, M. 2009. Adhésion de *Staphylococcus aureus* au verre et au téflon (Adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass and Teflon). *Revues Microbiologie Industrielle, Sanitaire et Environnementale*, 12, 1-16.
- HAMADI, F., LATRACHE, H., ZAHIR, H., EL ABED, S., ELLOUALI, M. & SAAD, I. K. 2012. The relation between the surface chemical composition of *Escherichia coli* and their electron donor/electron acceptor (acid-base) properties. *Research Journal of Microbiology*, 7, 32.

- HAMADI, F., LATRACHE, H., ZAHIR, H., ELGHMARI, A., TIMINOUNI, M. & ELLOUALI, M. 2008. The relation between *Escherichia coli* surface functional groups' composition and their physicochemical properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 10-5.
- HAMBLETON, P., BROSTER, M., DENNIS, P., HENSTRIDGE, R., FITZGEORGE, R. & CONLAN, J. 1983. Survival of virulent *Legionella pneumophila* in aerosols. *Journal of Hygiene*, 90, 451-60.
- HAN, J. H., NGUYEN, J. C., HARADA, S., BADDOUR, L. M. & EDELSTEIN, P. H. 2010. Relapsing *Legionella pneumophila* cellulitis: a case report and review of the literature. *J Infect Chemother*, 16, 439-42.
- HANCOCK, R., SIEHNEL, R. & MARTIN, N. 1990. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Molecular microbiology*, 4, 1069-75.
- HARB, O. S., GAO, L. Y. & KWAIK, Y. A. 2000. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environmental microbiology*, 2, 251-65.
- HARPER, G. & MORTON, J. 1953. The respiratory retention of bacterial aerosols: experiments with radioactive spores. *J. Hyg*, 51, 372-85.
- HARRISON, T. G., AFSHAR, B., DOSHI, N., FRY, N. K. & LEE, J. V. 2009. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28, 781-91.
- HEBERT, G. 1981. Hippurate hydrolysis by *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 13, 240-2.
- HELBIG, J., BERNANDER, S., PASTORIS, M. C., ETIENNE, J., GAIA, V., LAUWERS, S., LINDSAY, D., LÜCK, P., MARQUES, T. & MENTULA, S. 2002. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21, 710-6.
- HELBIG, J. H., KURTZ, J. B., PASTORIS, M. C., PELAZ, C. & LUCK, P. C. 1997. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol*, 35, 2841-5.
- 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, 64-8.
- HERMANSSON, M. 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 105-19.
- HEUKELEKIAN, H. & HELLER, A. 1940. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of bacteriology*, 40, 547.
- HEUNER, K., DIETRICH, C., SKRIWAN, C., STEINERT, M. & HACKER, J. 2002. Influence of the alternative  $\sigma_{28}$  factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*, 70, 1604-8.
- HILBERT, L. R., BAGGE-RAVN, D., KOLD, J. & GRAM, L. 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International biodeterioration & biodegradation*, 52, 175-85.
- HILBI, H., JARRAUD, S., HARTLAND, E. & BUCHRIESER, C. 2010. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol Microbiol*, 76, 1-11.
- HINES, S. A., CHAPPIE, D. J., LORDO, R. A., MILLER, B. D., JANKE, R. J., LINDQUIST, H. A., FOX, K. R., ERNST, H. S. & TAFT, S. C. 2014. Assessment of relative potential for *Legionella* species or surrogates inhalation exposure from common water uses. *Water Res*, 56, 203-13.
- HOANG, T. T. & SCHWEIZER, H. P. 1999. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *Journal of bacteriology*, 181, 5489-97.
- HU, C., XU, Z. & XIA, M. 2005. Antibacterial effect of Cu<sup>2+</sup>-exchanged montmorillonite on *Aeromonas hydrophila* and discussion on its mechanism. *Veterinary microbiology*, 109, 83-8.

- HUSSONG, D., COLWELL, R., O'BRIEN, M., WEISS, E., PEARSON, A., WEINER, R. & BURGE, W. 1987. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Nature Biotechnology*, 5, 947-50.
- HWANG, I. Y., PARK, E. H., PARK, Y. K., PARK, S. H., SUNG, G. H., PARK, H. Y. & LEE, Y. C. 2016. Distribution of *Legionella Pneumophila* Serogroups Isolated from Water Systems of Public Facilities in Busan, South Korea. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 47, 467-74.
- INVS 2016. Evolution du nombre de cas et du taux d'incidence de la légionellose en France et en Bretagne, 2006-2015 <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Ouest-Bretagne/2016/Surveillance-sanitaire-de-la-legionellose-en-Bretagne-en-2015>. Institut national de veille sanitaire, France. , 20/05/2017.
- JARRAUD, S., REYROLLE, M. & ETIENNE, J. 1999. Diagnostic des légionelloses. *Revue Francaise des Laboratoires*, 1999, 119-24.
- JARRAUD, S., REYROLLE, M. & ETIENNE, J. 2000. *Legionella* et légionellose. *Précis de bactériologie clinique*, J Freney,, F Renaud F., W Hansen, C Bollet C.(eds), éditions ESKA, Paris, 1389-405.
- JARRAUD, S., REYROLLE, M., MEUGNIER, H., FOREY, F. & ETIENNE, J. 2007. [Legionnaires disease]. *Presse Med*, 36, 279-87.
- JERNIGAN, D., HOFMANN, J., CETRON, M., NUORTI, J., FIELDS, B., BENSON, R., BREIMAN, R., LIPMAN, H., CARTER, R. & GENESE, C. 1996. Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *The Lancet*, 347, 494-9.
- JOLY, J. R., MCKINNEY, R. M., TOBIN, J. O., BIBB, W. F., WATKINS, I. D. & RAMSAY, D. 1986. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, 23, 768-71.
- JOLY, P., FALCONNET, P. A., ANDRE, J., WEILL, N., REYROLLE, M., VANDENESCH, F., MAURIN, M., ETIENNE, J. & JARRAUD, S. 2006. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2801-8.
- JONES, H., ROTH, I. & SANDERS, W. 1969. Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of bacteriology*, 99, 316-25.
- JULES, M. & BUCHRIESER, C. 2007. *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS letters*, 581, 2829-38.
- KAC, G. & FAGON, J. 2002. Legionnaires' disease: more unresolved questions. *La Revue de médecine interne/fondée... par la Société nationale française de médecine interne*, 23, 415.
- KAHN, R. A., FU, H. & ROY, C. R. 2002. Cellular hijacking: a common strategy for microbial infection. *Trends in biochemical sciences*, 27, 308-14.
- KANATANI, J. I., ISOBE, J., NORIMOTO, S., KIMATA, K., MITSUI, C., AMEMURA-MAEKAWA, J., KURA, F., SATA, T. & WATAHIKI, M. 2017. Prevalence of *Legionella* species isolated from shower water in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan. *J Infect Chemother*.
- KATSIKOIANNI, M. & MISSIRLIS, Y. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*, 8.
- KAWAI, K., URANO, M. & EBISU, S. 2000. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *The Journal of prosthetic dentistry*, 83, 664-7.
- KEEVIL, C. W. 2002. Pathogens in Environmental Biofilms. In: Bitton, G. (Ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, 4rd edn. New York: Wiley.
- KEEVIL, C. W. 2003. Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. *Water Sci Technol*, 47, 105-16.
- KHALEDI, A., ESMAEILI, S. A., VAZINI, H., KARAMI, P., BAHRAMI, A. & SAHEBKAR, A. 2019. Evaluation of the prevalence of *Legionella pneumophila* in Iranian clinical samples: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog*, 129, 93-8.
- KILB, B., LANGE, B., SCHAULE, G., FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. 2003. Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *Int J Hyg Environ Health*, 206, 563-73.

- KIM, B., ANDERSON, J., MUELLER, S., GAINES, W. & KENDALL, A. 2002. Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research*, 36, 4433-44.
- KIM BR, ANDERSON JE, MUELLER SA, GAINES WA & AM., K. 2002. Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 36, 4433-44.
- KLAHRE, J. & FLEMMING, H. 2000. Monitoring of biofouling in papermill process waters. *Water Research*, 34, 3657-65.
- KOIDE, M., SAITO, A., KUSANO, N. & HIGA, F. 1993. Detection of *Legionella* spp. in cooling tower water by the polymerase chain reaction method. *Appl Environ Microbiol*, 59, 1943-6.
- KONISHI, T., YAMASHIRO, T., KOIDE, M. & NISHIZONO, A. 2006. Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *J Biosci Bioeng*, 101, 478-84.
- KORENEVSKY, A. A., VINOGRADOV, E., GORBY, Y. & BEVERIDGE, T. J. 2002. Characterization of the Lipopolysaccharides and Capsules of *Shewanella* spp. *Applied and environmental microbiology*, 68, 4653-7.
- KOUBAR, M., RODIER, M. H. & FRERE, J. 2013. Involvement of minerals in adherence of *Legionella pneumophila* to surfaces. *Curr Microbiol*, 66, 437-42.
- KOZAK-MUIZNIEKS, N. A., LUCAS, C. E., BROWN, E., PONDO, T., TAYLOR, T. H., JR., FRACE, M., MISKOWSKI, D. & WINCHELL, J. M. 2014. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J Clin Microbiol*, 52, 201-11.
- KOZAK, N. A., BENSON, R. F., BROWN, E., ALEXANDER, N. T., TAYLOR, T. H., JR., SHELTON, B. G. & FIELDS, B. S. 2009. Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J Clin Microbiol*, 47, 2525-35.
- KREPSKY, N., FERREIRA, R. B. R., NUNES, A. P. F., LINS, U. G. C., E SILVA FILHO, F. C., DE MATTOS-GUARALDI, A. L. & NETTO-DOSSANTOS, K. R. 2003. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Current microbiology*, 46, 0280-6.
- KRUSE, E. B., WEHNER, A. & WISPLINGHOFF, H. 2016. Prevalence and distribution of *Legionella* spp in potable water systems in Germany, risk factors associated with contamination, and effectiveness of thermal disinfection. *Am J Infect Control*, 44, 470-4.
- KUIPER, M., WULLINGS, B., AKKERMANS, A., BEUMER, R. & VAN DER KOOIJ, D. 2004. Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Applid and Environmental Microbiology* 70, 6826-33.
- KWAIK, Y. A. 1996. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Applied and environmental microbiology*, 62, 2022-8.
- KWAIK, Y. A., 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. *Applied and environmental microbiology*, 64, 3127-33.
- LAMBERT, M. & MOSS, C. W. 1989. Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 465-73.
- LAMMERTYN, E. & ANNÉ, J. 2004. Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence. *FEMS microbiology letters*, 238, 273-9.
- LASHERAS, A., BOULESTREAU, H., ROGUES, A.-M., OHAYON-COURTES, C., LABADIE, J.-C. & GACHIE, J.-P. 2006. Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am. J. Infect. Control.*, 34, 520-5.
- LATRACHE, H., EL, G., KARROUA, M., HAKKOU, A., AIT, M., EL, B. & BOURLIOUX, P. 2002. Relations between hydrophobicity tested by three methods and surface chemical composition of *Escherichia coli*. *The new microbiologica*, 25, 75-82.

- LATRACHE, H., MOZES, N., PELLETIER, C. & BOURLIOUX, P. 1994. Chemical and physicochemical properties of *Escherichia coli*: variations among three strains and influence of culture conditions. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2, 47-56.
- LAU, H.-Y. & ASHBOLT, N. J. 2009. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 368-78.
- LAWRENCE, C., REYROLLE, M., DUBROU, S., FOREY, F., DECLUDT, B., GOULVESTRE, C., MATSIOTA-BERNARD, P., ETIENNE, J. & NAUCIEL, C. 1999. Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *Journal of clinical microbiology*, 37, 2652-5.
- LECLERC, H. 2005. *Legionella*: from environmental habitats to human disease. *Bull Acad Natl Med*, 189, 1221-33; discussion 33-4.
- LEHTOLA, M. J., MEITTINEN, I. T., KEINÄNEN, M. M., KEKKI, T. K., LAINE, O., HIRVONEN, A., VARTIKAINEN, T. & MARTIKAINEN, P. J. 2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Research*, 38, 3769-79.
- LEHTOLA, M. J., TORVINEN, E., KUSNETZOV, J., PITKANEN, T., MAUNULA, L., VON BONSDORFF, C. H., MARTIKAINEN, P. J., WILKS, S. A., KEEVIL, C. W. & MEITTINEN, I. T. 2007. Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli* and caliciviruses in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2854-9.
- 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, 373-9.
- LEVI, Y. 2001. Écologie microbienne des réseaux d'eau potable et risque microbiologique: l'exemple de *Legionella pneumophila*. *Revue Française des Laboratoires*, 2001, 33-7.
- LIESEGANG, T. J. 1997. Contact lens-related microbial keratitis: Part II: Pathophysiology. *Cornea*, 16, 265-73.
- LIM, Y. H., RELUS KEK, Y. L., LIM, P. Y., YAP, H. M., VIVIEN GOH, T. L. & NG, L. C. 2011. Environmental surveillance and molecular characterization of *Legionella* in tropical Singapore. *Trop Biomed*, 28, 149-59.
- LIN, Y. E., STOUT, J. E. & YU, V. L. 2011. Controlling *Legionella* in hospital drinking water: an evidence-based review of disinfection methods. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 32, 166-73.
- LIU, Z., LIN, Y. E., STOUT, J. E., HWANG, C. C., VIDIC, R. D. & YU, V. L. 2006. Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system. *J Appl Microbiol*, 101, 437-42.
- LUCK, C., FRY, N. K., HELBIG, J. H., JARRAUD, S. & HARRISON, T. G. 2013. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol Biol*, 954, 119-48.
- LUCK, P. C., BENDER, L., OTT, M., HELBIG, J. H. & HACKER, J. 1991. Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 6 strains isolated from a hospital warm water supply over a three-year period by using genomic long-range mapping techniques and monoclonal antibodies. *Appl Environ Microbiol*, 57, 3226-31.
- LUCK, P. C., HELBIG, J. H., GUNTER, U., ASSMANN, M., BLAU, R., KOCH, H. & KLEPP, M. 1994. Epidemiologic investigation by macrorestriction analysis and by using monoclonal antibodies of nosocomial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10. *J Clin Microbiol*, 32, 2692-7.
- MAGNUSSON, K.-E., STENDAHL, O., TAGESSON, C., EDEBO, L. & JOHANSSON, G. 1977. The tendency of smooth and rough *salmonella typhi* murium bacteria and lipopolysaccharide to hydrophobic and ionic interaction, as studied in aqueous polymer two-phase systems. *APMIS*, 85, 212-8.
- MAHBUBANI, M. H., BEJ, A. K., MILLER, R., HAFF, L., DICESARE, J. & ATLAS, R. M. 1990. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol Cell Probes*, 4, 175-87.
- MARCHESI, I., FERRANTI, G., MANSI, A., MARCELLONI, A. M., PROIETTO, A. R., SAINI, N., BORELLA, P. & BARGELLINI, A. 2016. Control of *Legionella* Contamination and Risk of

- Corrosion in Hospital Water Networks following Various Disinfection Procedures. *Appl Environ Microbiol*, 82, 2959-65.
- MAROTTA, M., MARTINO, A., DE ROSA, A., FARINA, E., CARTENI, M. & DE ROSA, M. 2002. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. *Process Biochemistry*, 38, 101-8.
- MARQUES, T. & PIEDADE, J. 1997. Susceptibility testing by E-test and agar dilution of 30 strains of *Legionella* spp. isolated in Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.*, 3, 365-8.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 9607-11.
- MATHYS, W., STANKE, J., HARMUTH, M. & JUNGE-MATHYS, E. 2008. Occurrence of *Legionella* in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating. *Int J Hyg Environ Health*, 211, 179-85.
- MCCONKEY, J., OBEIUS, M., VALENTINI, J. & BEESON, M. S. 2006. *Legionella* pneumonia presenting with rhabdomyolysis and acute renal failure: a case report. *J Emerg Med*, 30, 389-92.
- MCCOY, W. F., DOWNES, E. L., LEONIDAS, L. F., CAIN, M. F., SHERMAN, D. L., CHEN, K., DEVENDER, S. & NEVILLE, M. J. 2012. Inaccuracy in *Legionella* tests of building water systems due to sample holding time. *Water Res*, 46, 3497-506.
- MCDADE, J. E., SHEPARD, C. C., FRASER, D. W., TSAI, T. R., REDUS, M. A. & DOWDLE, W. R. 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*, 297, 1197-203.
- MEGARBANE, B., MONTAMBAULT, S., CHARY, I., GUIBERT, M., AXLER, O. & BRIVET, F. G. 2000. Acute pancreatitis caused by severe *Legionella pneumophila* infection. *Infection*, 28, 329-31.
- MEHIRI-ZGHAL, E., ESSALAH, L., GHARIANI, A., MAHJOUBI, W., REYROLLE, M., MEUGNIER, H., FOREY, F., JARRAUD, S., FRENEY, J., ETIENNE, J. & SLIM-SAIDI, L. 2008. [Molecular comparison of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolated in Tunisia]. *Pathol Biol (Paris)*, 56, 279-82.
- MEKKOUR, M., DRISS, K. B., JARRAUD, S., TAI, J. & SQUINAZI, F. 2013a. Investigation of *Legionella pneumophila* serogroup 1 population in Morocco by monoclonal antibody subtyping. *International Journal of Emerging Sciences*, 3, 43.
- MEKKOUR, M., KHALIL, E., DRISS, B., TAI, J., COHEN, N., DE MICROBIOLOGIE, D., ENVIRONNEMENT, D. & PASTEUR, I. 2013b. *Legionella pneumophila*: an environmental organism and accidental pathogen. *Int J Sci Technol*, 2, 187-96.
- MENON, K. V. 2016. Biofilm and Food industry. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 3, 137-42.
- MIYAKE, M., FUKUI, T. & IMAI, Y. 2006. Differences in protein synthesis between wild type and intracellular growth-deficient strains of *Legionella pneumophila* in U937 and *Acanthamoeba polyphaga*. *Microb Pathog*, 40, 161-70.
- MIYAMOTO, H., YAMAMOTO, H., ARIMA, K., FUJII, J., MARUTA, K., IZU, K., SHIOMORI, T. & YOSHIDA, S. 1997. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol*, 63, 2489-94.
- MOMBA, M. N. & MAKALA, N. 2004. Comparing the effect of various pipe materials on biofilm formation in chlorinated and combined chlorine-chloraminated water systems. 30, 175-82.
- MONDINO, S., SCHMIDT, S., ROLANDO, M., ESCOLL, P., GOMEZ-VALERO, L. & BUCHRIESER, C. 2019. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*. *Annu Rev Pathol*.
- MORTON, L., GREENWAY, D., GAYLARDE, C. & SURMAN, S. 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 247-59.
- MOUCHTOURI, V., VELONAKIS, E. & HADJICHRISTODOULOU, C. 2007a. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. *Am J Infect Control*, 35, 623-7.

- MOUCHTOURI, V., VELONAKIS, E., TSAKALOF, A., KAPOULA, C., GOUTZIANA, G., VATOPOULOS, A., KREMASTINO, J. & HADJICHRISTODOULOU, C. 2007b. Risk factors for contamination of hotel water distribution systems by *Legionella* species. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1489-92.
- MOUCHTOURI, V. A., GOUTZIANA, G., KREMASTINO, J. & HADJICHRISTODOULOU, C. 2010. *Legionella* species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control*, 38, 50-5.
- MOZES, N., AMORY, D., LEONARD, A. & ROUXHET, P. 1989. Surface properties of microbial cells and their role in adhesion and flocculation. *Colloids and surfaces*, 42, 313-29.
- MOZES, N., LÉONARD, A. & ROUXHET, P. G. 1988. On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 945, 324-34.
- MUCHESA, P., LEIFELS, M., JURZIK, L., HOORZOOK, K. B., BARNARD, T. G. & BARTIE, C. 2017. Coexistence of free-living amoebae and bacteria in selected South African hospital water distribution systems. *Parasitol Res*, 116, 155-65.
- NAPOLI, C., FASANO, F., IATTA, R., BARBUTI, G., CUNA, T. & MONTAGNA, M. T. 2010. *Legionella* spp. and legionellosis in southeastern Italy: disease epidemiology and environmental surveillance in community and health care facilities. *BMC Public Health*, 10, 660.
- NEMATI, M., JENNEMAN, G. & VOORDOUW, G. 2001. Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. *Biotechnology and bioengineering*, 74, 424-34.
- NG, D. L., KOH, B. B., TAY, L. & HENG, B. H. 1997. Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of legionellae in cooling tower waters in Singapore. *Lett Appl Microbiol*, 24, 214-6.
- NORTON, C. D. & LECHEVALLIER, M. W. 2000. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 268-76.
- O'NEILL, E. & HUMPHREYS, H. 2005. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence? *J Hosp Infect*, 59, 273-9.
- O'TOOLE, G. A. & KOLTER, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30, 295-304.
- ODER, M., KOMPARE, B., BOHINC, K. & TORKAR, K. G. 2015. The impact of material surface roughness and temperature on the adhesion of *Legionella pneumophila* to contact surfaces. *Int J Environ Health Res*, 25, 469-79.
- OHNISHI, H., MIZUNOE, Y., TAKADE, A., TANAKA, Y., MIYAMOTO, H., HARADA, M. & YOSHIDA, S.-I. 2004. *Legionella dumoffii* DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. *Infection and immunity*, 72, 3592-603.
- 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, 2540-7.
- OKUDA, S., IGARASHI, R., KUSUI, Y., KASAHARA, Y. & MORISAKI, H. 2003. Electrophoretic mobility of *Bacillus subtilis* knockout mutants with and without flagella. *Journal of bacteriology*, 185, 3711-7.
- ORTIZ-ROQUE, C. M. & HAZEN, T. C. 1987. Abundance and distribution of Legionellaceae in Puerto Rican waters. *Appl Environ Microbiol*, 53, 2231-6.
- OTM 2017. Statistiques sur le tourisme au maroc entre janvier et mai 2017. Observatoire du tourisme au Maroc. <http://www.observatoiredutourisme.ma/tableaux-de-bord-nationaux-2017/>, consulté le 20/09/2019.
- PAGEDAR, A., SINGH, J. & BATISH, V. K. 2010. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. *Journal of basic microbiology*, 50.
- PALMER, C. J., TSAI, Y. L., PASZKO-KOLVA, C., MAYER, C. & SANGERMANO, 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, 3618-24.
- PALMER, J., FLINT, S. & BROOKS, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34, 577-88.



- PALUSIŃSKA-SZYSZ, M. & CENDROWSKA-PINKOSZ, M. 2009. Pathogenicity of the family Legionellaceae. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 57, 279-90.
- PÉCASTAINGS, S. 2010. Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- PECASTAINGS, S., BERGE, M., DUBOURG, K. M. & ROQUES, C. 2010. Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. *Biofouling*, 26, 809-19.
- PEDRO-BOTET, M. L., STOUT, J. E. & YU, V. L. 2002. Legionnaires' disease contracted from patient homes: the coming of the third plague? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 21, 699-705.
- PEDRO-BOTET, M. L. & YU, V. L. 2009. Treatment strategies for *Legionella* infection. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 10, 1109-21.
- PEDRO-BOTET, L. & YU, V. 2006. Legionella: macrolides or quinolones? *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 25-30.
- PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P. & BELLON-FONTAINE, M.-N. 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and environmental microbiology*, 63, 1725-31.
- PHILIPPE, C., BLECH, M. & HARTEMANN, P. 2006. [Intra-amoebal development of *Legionella pneumophila* and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaires' disease]. *Médecine et maladies infectieuses*, 36, 196-200.
- PHIN, N., PARRY-FORD, F., HARRISON, T., STAGG, H. R., ZHANG, N., KUMAR, K., LORTHOLARY, O., ZUMLA, A. & ABUBAKAR, I. 2014. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis*, 14, 1011-21.
- PIAO, Z., SZE, C. C., BARYSHEVA, O., IIDA, K.-I. & YOSHIDA, S.-I. 2006. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Applied and environmental microbiology*, 72, 1613-22.
- PINE, L., GEORGE, J., REEVES, M. & HARRELL, W. K. 1979. Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 9, 615-26.
- PRATT, L. A. & KOLTER, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, 30, 285-93.
- QIN, T., REN, H., CHEN, D., ZHOU, H., JIANG, L., WU, D., SHEN, J. & PEI, F. 2019. National Surveillance of Legionnaires' Disease, China, 2014–2016. *Emerging infectious diseases*, 25, 1218.
- RAFIEE, M., MESDAGHINIA, A., HAJJARAN, H., HAJAGHAZADEH, M., MIAHIPOUR, A. & JAHANGIRI-RAD, M. 2014. The Efficacy of Residual Chlorine Content on the Control of *Legionella* Spp. In Hospital Water Systems. *Iran J Public Health*, 43, 637-44.
- RATZOW, S., GAIA, V., HELBIG, J. H., FRY, N. K. & LUCK, P. C. 2007. Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol*, 45, 1965-8.
- REIFSTECK, F., WEE, S. & WILKINSON, B. 1987. Hydrophobicity—hydrophilicity of staphylococci. *Journal of medical microbiology*, 24, 65-73.
- REIMER, A. R., AU, S., SCHINDLE, S. & BERNARD, K. A. 2010. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29, 191-205.
- RICHARDS, J. J. & MELANDER, C. 2009. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem*, 10, 2287-94.
- RIFFARD, S., DOUGLASS, S., BROOKS, T., SPRINGTHORPE, S., FILION, L. G. & SATTAR, S. A. 2001. Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Sci Technol*, 43, 99-102.
- RODGERS, F., GREAVES, P., MACRAE, A. & LEWIS, M. 1980. Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical pathology*, 33, 1184-8.



- RODGERS, F., MACRAE, A. & LEWIS, M. 1978. Electron microscopy of the organism of Legionnaires' disease.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, S., SHARABY, Y., PECELLIN, M., BRETTAR, I., HOFLE, M. & HALPERN, M. 2015. Spatial distribution of *Legionella pneumophila* MLVA-genotypes in a drinking water system. *Water Res*, 77, 119-32.
- ROGERS, J., DOWSETT, A., DENNIS, P., LEE, J. & KEEVIL, C. 1994b. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol* 60, 1842-51.
- ROGERS, J., DOWSETT, A. B., DENNIS, P. J., LEE, J. V. & KEEVIL, C. W. 1994a. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. 60, 1585-1592.
- ROIG, J. & RELLO, J. 2003. Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1119-29.
- ROTA, M., SCATURRO, M., FONTANA, S., FORONI, M., BOSCHETTO, G., TRENTIN, L., BLENGIO, G., BANDETTINI, G., BURATTO, T., CAPORALI, M., NAPOLI, C. & RICCI, M. 2011. Cluster of travel-associated Legionnaires disease in Lazise, Italy, July to August 2011. *Euro Surveill*, 16.
- ROUXHET, P., MOZES, N., DENGIS, P., DUFRÊNE, Y., GERIN, P. A. & GENET, M. 1994. Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2, 347-69.
- ROYSTED, W., SIMONSEN, O., JENKINS, A., SARJOMAA, M., SVENDSEN, M. V., RAGNHILDSTVEIT, E., TVETEN, Y., KANESTROM, A., WAAGE, H. & RINGSTAD, J. 2016. Aetiology and risk factors of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Norway. *Clin Respir J*, 10, 756-64.
- SAKAMOTO, R., OHNO, A., NAKAHARA, T., SATOMURA, K., IWANAGA, S., KOUYAMA, Y., KURA, F., KATO, N., MATSUBAYASHI, K., OKUMIYA, K. & YAMAGUCHI, K. 2009. *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. *Emerg Infect Dis*, 15, 1295-7.
- SALDAÑA, Z., XICOHTENCATL-CORTES, J., AVELINO, F., PHILLIPS, A. D., KAPER, J. B., PUENTE, J. L. & GIRÓN, J. A. 2009. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environmental microbiology*, 11, 992-1006.
- SANCHEZ-BUSO, L., COMAS, I., JORQUES, G. & GONZALEZ-CANDELAS, F. 2014. Recombination drives genome evolution in outbreak-related *Legionella pneumophila* isolates. *Nat Genet*, 46, 1205-11.
- SANCHEZ-BUSO, L., OLMOS, M. P., CAMARO, M. L., ADRIAN, F., CALAFAT, J. M. & GONZALEZ-CANDELAS, F. 2015. Phylogenetic analysis of environmental *Legionella pneumophila* isolates from an endemic area (Alcoy, Spain). *Infect Genet Evol*, 30, 45-54.
- SANDALAKIS, V., CHOCHLAKIS, D., GONIOTAKIS, I., TSELENTIS, Y. & PSAROULAKI, A. 2014. Minimum inhibitory concentration distribution in environmental *Legionella* spp. isolates. *J. Water. Health.*, 12, 678-85.
- SANLI-YURUDU, N. O., KIMIRAN-ERDEM, A. & COTUK, A. 2007. Studies on the efficacy of Chloramine T trihydrate (N-chloro-p-toluene sulfonamide) against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains. *Int J Hyg Environ Health*, 210, 147-53.
- SCHOEN, M. E. & ASHBOLT, N. J. 2011. An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events. *Water research*, 45, 5826-36.
- SEGAL, G., RUSSO, J. J. & SHUMAN, H. A. 1999a. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Molecular microbiology*, 34, 799-809.
- SELANDER, R. K., MCKINNEY, R. M., WHITTAM, T. S., BIBB, W. F., BRENNER, D. J., NOLTE, F. S. & PATTISON, P. E. 1985. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 163, 1021-37.
- SERRANO-SUAREZ, A., DELLUNDE, J., SALVADO, H., CERVERO-ARAGO, S., MENDEZ, J., CANALS, O., BLANCO, S., ARCAS, A. & ARAUJO, R. 2013. Microbial and physicochemical

- parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. *Environ Sci Pollut Res Int*, 20, 5534-44.
- SHAH, P. P., BARSKEY, A. E., BINDER, A. M., EDENS, C., LEE, S., SMITH, J. C., SCHRAG, S., WHITNEY, C. G. & COOLEY, L. A. 2018. Legionnaires' disease surveillance summary report, United States: 2014-2015.
- SHOHDY, N., EFE, J. A., EMR, S. D. & SHUMAN, H. A. 2005. Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4866-71.
- SILVA, S., TEIXEIRA, P., OLIVEIRA, R. & AZEREDO, J. 2008. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 71, 1379-85.
- SKJEVRAK, I., DUE, A., GJERSTAD, K. O. & HERIKSTAD, H. 2003. Volatile organic components migrating from plastic pipes (HDPE, PEX and PVC) into drinking water. *Water research*, 37, 1912-20.
- SÖDERBERG, M. A., ROSSIER, O. & CIANCOTTO, N. P. 2004. The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *Journal of bacteriology*, 186, 3712-20.
- SOUMYA, E., SAAD, I. K., ABDELLAH, H. & HASSAN, L. 2013. Experimental and theoretical investigations of the adhesion time of *Penicillium* spores to cedar wood surface. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 1276-81.
- SPRINGSTON, J. P. & YOCAVITCH, L. 2017. Existence and control of *Legionella* bacteria in building water systems: A review. *J Occup Environ Hyg*, 14, 124-34.
- STEINERT, M., HENTSCHEL, U. & HACKER, J. 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 149-62.
- STEINERT, M., HEUNER, K., BUCHRIESER, C., ALBERT-WEISSENBERGER, C. & GLOCKNER, G. 2007. *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol*, 297, 577-87.
- STEINERT, M., OCKERT, G., LUCK, C. & HACKER, J. 1998. Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralbl Bakteriol*, 288, 331-42.
- STEWART, C. R., ROSSIER, O. & CIANCOTTO, N. P. 2009. Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *Journal of bacteriology*, 191, 1537-46.
- STONE, B. J. & KWAIK, Y. A. 1999. Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *Journal of bacteriology*, 181, 1395-402.
- STOUT, J., YU, V. & BEST, M. 1985. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Applied and environmental microbiology*, 49, 221-8.
- STOUT, J. E., SENS, K., MIETZNER, S., OBMAN, A. & YU, V. L. 2005. Comparative activity of quinolones, macrolides and ketolides against *Legionella* species using in vitro broth dilution and intracellular susceptibility testing. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 25, 302-7.
- STOUT, J. E. & YU, V. L. 2003. Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for *Legionella* control: implications for the evaluation of other disinfection modalities. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 24, 563-8.
- STRAUS, W. L., PLOUFFE, J. F., FILE, T. M., JR., LIPMAN, H. B., HACKMAN, B. H., SALSTROM, S. J., BENSON, R. F. & BREIMAN, R. F. 1996. Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires Disease Group. *Arch Intern Med*, 156, 1685-92.
- SUTHERLAND, E. & BERK, S. 1996. Survival of protozoa in cooling tower biocides. *Journal of industrial microbiology*, 16, 73-8.
- SWANSON, M. & HAMMER, B. 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Reviews in Microbiology*, 54, 567-613.
- SZEWZYK, U., SZEWZYK, R., MANZ, W. & SCHLEIFER, K. H. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annu Rev Microbiol*, 54, 81-127.
- TAI, J., BENCHEKROUN, M. N., MEKKOUR, M., ENNAJI, M. M., NADER, H. & COHEN, N. 2012a. Investigation of *Legionella Pneumophila* in Hot Water Systems in Morocco. *Int J Sci Technol*, 1, 524-30.

- TAI, J., MLIJI, M., BENCHEKROUN, M. N., ENNAJI, M. M., MEKKOUR, M., ENNAJI, H. & COHEN, N. 2012b. Biofilm Formation by *Legionella pneumophila* in Water Distribution Systems: Role of Supports and Temperatures. *International Journal of Hydraulic Engineering*, 1, 48-54.
- TANABE, M., NAKAJIMA, H., NAKAMURA, A., ITO, T., NAKAMURA, M., SHIMONO, T., WADA, H., SHIMPO, H., NOBORI, T. & ITO, M. 2009. Mycotic aortic aneurysm associated with *Legionella anisa*. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 2340-3.
- TAYLOR, M., ROSS, K. & BENTHAM, R. 2009a. Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microbial ecology*, 58, 538-47.
- TAYLOR, M., ROSS, K. & BENTHAM, R. 2009b. *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol*, 58, 538-47.
- TAYLOR, M., ROSS, K. & BENTHAM, R. 2013. Spatial arrangement of *Legionella* colonies in intact biofilms from a model cooling water system. *Microbiology insights*, 6, 49.
- TEIXEIRA, P., LIMA, J., AZEREDO, J. & OLIVEIRA, R. 2008. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. *International journal of food science & technology*, 43, 1239-44.
- TEIXEIRA, P. & OLIVEIRA, R. 1999. Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. *Journal of adhesion science and technology*, 13, 1287-94.
- TEMMERMAN, R., VERVAEREN, H., NOSEDA, B., BOON, N. & VERSTRAETE, W. 2006a. Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Applied and environmental microbiology*, 72, 4323-8.
- TEMMERMAN, R., VERVAEREN, H., NOSEDA, B., BOON, N. & VERSTRAETE, W. 2006b. Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 4323-8.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H. & SWAMINATHAN, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33, 2233.
- TESAURO, M., BIANCHI, A., CONSONNI, M., PREGLIASCO, F. & GALLI, M. G. 2010. Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in two Italian hospitals. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 46, 274-8.
- TESH, M. J. & MILLER, R. D. 1982. Growth of *Legionella pneumophila* in defined media: requirement for magnesium and potassium. *Can J Microbiol*, 28, 1055-8.
- THOMAS, V. 2004. *Ecologie de Legionella pneumophila dans les réseaux de distribution d'eau potable*. Université Paris Sud-Paris XI.
- THOMAS, V., BOUCHEZ, T., NICOLAS, V., ROBERT, S., LORET, J. & LEVI, Y. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of applied microbiology*, 97, 950-63.
- THOMASON, B. M., HARRIS, P. P., HICKLIN, M. D., BLACKMON, J. A., MOSS, C. W. & MATTHEWS, F. 1979. A *Legionella*-like bacterium related to WIGA in a fatal case of pneumonia. *Annals of internal medicine*, 91, 673-6.
- TIJET, N., TANG, P., ROMILOWYCH, M., DUNCAN, C., NG, V., FISMAN, D. N., JAMIESON, F., LOW, D. E. & GUYARD, C. 2010. New endemic *Legionella pneumophila* serogroup I clones, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis*, 16, 447-54.
- TOSSA, P., DELOGE-ABARKAN, M., ZMIROU-NAVIER, D., HARTEMANN, P. & MATHIEU, L. 2006. Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health*, 6, 1.
- TREMBLAY, Y. D., HATHROUBI, S. & JACQUES, M. 2014. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78, 110-6.
- TROUILHÉ, M.-C. 2010. Maîtrise du risque légionelles par désinfection au point d'usage: apport de la technologie Behring™-Essais à l'échelle pilote. *L'Eau, l'industrie, les nuisances*, 90-3.
- UNDERWOOD, A. P., JONES, G., MENTASTI, M., FRY, N. K. & HARRISON, T. G. 2013. Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. *BMC Microbiol*, 13, 302.

- VAN DER KOOIJ, D., BAKKER, G. L., ITALIAANDER, R., VEENENDAAL, H. R. & WULLINGS, B. A. 2017. Biofilm Composition and Threshold Concentration for Growth of *Legionella Pneumophila* on Surfaces Exposed to Flowing Warm Tap Water without Disinfectant. *Appl Environ Microbiol.*
- 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 research*, 39, 2789-98.
- VAN DER MEI, H., BROKKE, P., DANKERT, J., JAN, F., ROUXHET, P. & BUSSCHER, H. 1989. Physicochemical surface properties of nonencapsulated and encapsulated coagulase-negative staphylococci. *Applied and environmental microbiology*, 55, 2806-14.
- VAN DER MEI, H., DE VRIES, J. & BUSSCHER, H. 1993. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. *Applied and environmental microbiology*, 59, 4305-12.
- VAN DER MEI, H. C., VAN DE BELT-GRITTER, B., REID, G., BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H. & BUSSCHER, H. J. 1997. Adhesion of coagulase-negative staphylococci grouped according to physico-chemical surface properties. *Microbiology*, 143, 3861-70.
- VAN HEIJNSBERGEN, E., SCHALK, J. A., EUSER, S. M., BRANDSEMA, P. S., DEN BOER, J. W. & DE RODA HUSMAN, A. M. 2015. Confirmed and Potential Sources of *Legionella* Reviewed. *Environ Sci Technol*, 49, 4797-815.
- VAN LOOSDRECHT, M., LYKLEMA, J., NORDE, W., SCHRAA, G. & ZEHNDER, A. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and environmental microbiology*, 53, 1893-7.
- VAN OSS, C. 1994. Interfacial forces in aqueous media. Marcel Dekker, New York. *Interfacial forces in aqueous media. Marcel Dekker, New York.*, -.
- VAN OSS, C. 1995. Hydrophobicity of biosurfaces—origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 5, 91-110.
- VAN OSS, C., GOOD, R. & CHAUDHURY, M. 1986. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of colloid and Interface Science*, 111, 378-90.
- VAN OSS, C., GOOD, R. & CHAUDHURY, M. 1988. Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir*, 4, 884-91.
- VARNER, T. R., BOOKSTAVAR, P. B., RUDISILL, C. N. & ALBRECHT, H. 2011. Role of rifampin-based combination therapy for severe community-acquired *Legionella pneumophila* pneumonia. *Ann. Pharmacother.*, 45, 967-76.
- VERONESI, L., CAPOBIANCO, E. & AFFANNI, P. 2007. Legionella contamination in the water system of hospital dental settings. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis*, 78, 117-22.
- VERRAN, J., LEES, G. & SHAKESPEARE, A. P. 1991. The effect of surface roughness on the adhesion of *Candida albicans* to acrylic. *Biofouling*, 3, 183-91.
- 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, 357-63.
- VICTOR, L. Y., PLOUFFE, J. F., PASTORIS, M. C., STOUT, J. E., SCHOUSBOE, M., WIDMER, A., SUMMERSGILL, J., FILE, T., HEATH, C. M. & PATERSON, D. L. 2002. Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 127-8.
- VOGEL, J. P. & ISBERG, R. R. 1999. Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Current opinion in microbiology*, 2, 30-4.
- VOGLER, E. A. 1998. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in colloid and interface science*, 74, 69-117.
- WANG, C., CHUAI, X. & LIANG, M. 2019. *Legionella feeleyi*: pneumonia or Pontiac fever? Bacterial virulence traits and host immune response. *Med Microbiol Immunol*, 208, 25-32.
- WEISS, E. & WESTFALL, H. N. 1984. Substrate utilization by *Legionella* cells after cryopreservation in phosphate buffer. *Appl Environ Microbiol*, 48, 380-5.

- WÉRY, N., BRU-ADAN, V., MINERVINI, C., DELGÉNES, J.-P., GARRELLY, L. & GODON, J.-J. 2008. Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Applied and environmental microbiology*, 74, 3030-7.
- WHILEY, H. & BENTHAM, R. 2011. *Legionella longbeachae* and legionellosis. *Emerg Infect Dis*, 17, 579-83.
- WHILEY, H., KEEGAN, A., FALLOWFIELD, H. & ROSS, K. 2014. Uncertainties associated with assessing the public health risk from *Legionella*. *Frontiers in microbiology*, 5, 501.
- WHO 2011. *Securité sanitaire de l'eau dans les bâtiments*, Organisation mondiale de la Santé.
- WINGENDER, J. & FLEMMING, H.-C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International journal of hygiene and environmental health*, 214, 417-23.
- WINGENDER, J. & FLEMMING, H. C. 2004. Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Water science and technology* 49, 277-86.
- WINN, W. C. 1988. Legionnaires disease: historical perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 1, 60-81.
- WUTHRICH, D., GAUTSCH, S., SPIELER-DENZ, R., DUBUIS, O., GAIA, V., MORAN-GILAD, J., HINIC, V., SETH-SMITH, H. M., NICKEL, C. H., TSCHUDIN-SUTTER, S., BASSETTI, S., HAENGGI, M., BRODMANN, P., FUCHS, S. & EGLI, A. 2019. Air-conditioner cooling towers as complex reservoirs and continuous source of *Legionella pneumophila* infection evidenced by a genomic analysis study in 2017, Switzerland. *Euro Surveill*, 24.
- XIONG, L., YAN, H., SHI, L. & MO, Z. 2016. Antibiotic susceptibility of *Legionella* strains isolated from public water sources in Macau and Guangzhou. *J. Water. Health.*, 14, 1041-6.
- YAMAMOTO, H., SUGIURA, M., KUSUNOKI, S., EZAKI, T., IKEDO, M. & YABUUCHI, E. 1992. Factors stimulating propagation of legionellae in cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1394-7.
- YANEZ, M. A., NOCKER, A., SORIA-SORIA, E., MURTULA, R., MARTINEZ, L. & CATALAN, V. 2011. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J Microbiol Methods*, 85, 124-30.
- YARADOU, D. F., HALLIER-SOULIER, S., MOREAU, S., POTY, F., HILLION, Y., REYROLLE, M., ANDRE, J., FESTOC, G., DELABRE, K., VANDENESCH, F., ETIENNE, J. & JARRAUD, S. 2007. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1452-6.
- YU, P. Y., LIN, Y. E., LIN, W. R., SHIH, H. Y., CHUANG, Y. C., BEN, R. J., HUANG, W. K., CHEN, Y. S., LIU, Y. C., CHANG, F. Y., YEN, M. Y., LIU, C. C., KO, W. C., LIN, H. H. & SHI, Z. Y. 2008. The high prevalence of *Legionella pneumophila* contamination in hospital potable water systems in Taiwan: implications for hospital infection control in Asia. *Int J Infect Dis*, 12, 416-20.
- ZACHEUS, O. M. & MARTIKAINEN, P. J. 1994. Occurrence of *legionellae* in hot water distribution systems of Finnish apartment buildings. *Can J Microbiol*, 40, 993-9.
- ZAHIR, H., FATIMA, H., SOUAD, L., EL MOSTAFA, M., MOSTAFA, E. & HASSAN, L. 2015. Role of Cell Surface Structures in Biofilm Formation by *Escherichia coli*. *Food and Nutrition Sciences*, 6, 1160.
- ZHANG, C. & KUSPA, A. 2009. Transcriptional down-regulation and rRNA cleavage in *Dictyostelium discoideum* mitochondria during *Legionella pneumophila* infection. *PLoS One*, 4, e5706.
- ZHOU, H., REN, H., ZHU, B., KAN, B., XU, J. & SHAO, Z. 2010. Optimization of pulsed-field gel electrophoresis for *Legionella pneumophila* subtyping. *Appl Environ Microbiol*, 76, 1334-40.
- ZIETZ, B., WIESE, J., BRENGELMANN, F. & DUNKELBERG, H. 2001. Presence of *Legionellaceae* in warm water supplies and typing of strains by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*, 126, 147-52.
- ZOBELL, C. E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology*, 46, 39.

---

## ***ANNEXES***

---



## QUESTIONNAIRE / Projet PPR 2015/16

### Contexte et Objectifs :

La légionellose est une infection pulmonaire provoquée par des bactéries de l'eau : les légionelles. La contamination de l'homme se fait par inhalation d'eau contaminée diffusée sous forme d'aérosols, à l'occasion de douches par exemple. En vertu du nombre important des touristes qui est en augmentation continue, le Maroc doit assurer un séjour sécurisé sur le plan sanitaire, et cerner toutes les défaillances qui pourraient nuire à l'option de « Tourisme Durable » et cela par l'instauration d'une réglementation qui impose aux établissements recevant du public possédant des points d'usage à risque (douches, bains à remous, douchettes cuisine, ...) de mettre en œuvre une surveillance de leurs installations collectives de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

Dans ce cadre nous menons un travail de recherche scientifique qui s'intéresse à la détermination d'éléments d'analyse de risque relatif à *L. pneumophila* dans les établissements hôteliers Marocains. Ce travail fait partie d'un projet de recherche porté par l'Institut Pasteur du Maroc et financé par le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique. A cet effet, une cartographie d'étude a été consentie entre le Laboratoire de la Microbiologie des Eaux et Hygiène de l'Environnement de l'Institut Pasteur du Maroc et le Ministère de Tourisme Marocain. C'est ainsi que les structures ciblées par cette étude sont des établissements hôteliers appartenant aux principales villes touristiques du Maroc à savoir Agadir, Casablanca, Dakhla, Fès, Layoune, Marrakech, Ouarzazate, Rabat et Tanger. L'objectif est de rassembler le maximum des données scientifiques sur la présence de *Legionella* dans les établissements hôteliers du Maroc, afin de contribuer à la gestion des risques liées à la prolifération de cette bactérie dans les réseaux d'eaux chaudes.

Des prélèvements d'eaux chaudes seront réalisés dont l'analyse au laboratoire sera gratuite, par la suite, chaque établissement participant reçoit une lettre avec les résultats de recherche et dénombrement de *Legionella*, ainsi des recommandations en cas de besoin.

En complétant ce questionnaire, vous ferez preuve de transparence et de solidarité. Sachez que les informations contenues dans ce questionnaire resteront confidentielles.

## I- Identification de l'organisme :

- Code anonymat : .....
- Nom de l'établissement : .....
- Adresse : .....
- Ville : .....
- Statut : ..... (Public ou Privé).
- Nombre total de lits : .....
- Durée moyenne de séjour : ..... Jours
- Les chambres sont-elles équipées de douches ? Non ☐ Oui ☐  
Nombre : .....
- Existe-il un prestataire extérieur chargé de la maintenance du réseau d'eau ?  
Non ☐ Oui ☐

Si oui quelles sont les tâches ou missions qui lui sont confiées :

.....  
.....

## II-CONCEPTION DE L'INSTALLATION D'EAU CHAUDE

- Nombre de réseaux d'eau chaude sanitaire (ECS) : .....
- De quel(s) matériau(x) est (sont) constitué(s) le(s) réseau(x) d'ECS :

Cuivre ☐ Acier inoxydable ☐ le PVC chloré ☐

Polypropylène PER : ☐ Polyéthylène réticulé ☐ Acier galvanisé ☐  
☐ Autres (préciser) : .....

- Existe-il des bras morts au seins de la canalisation d'eau ?

Oui ☐ Non ☐

- Existence d'interconnexions entre le réseau d'eau froide et d'autres réseaux

Non ☐ Oui ☐

Si oui, localisation : .....

- Existence de manchettes témoins ☐ Non ☐ Oui ☐



- Ages du ou des réseaux(x) actuel(s) : 1. \_\_\_\_\_ ans  
2. \_\_\_\_\_ ans 3. \_\_\_\_\_ ans.

- Nombre d'installations de production d'ECS existantes ?

.....

- Nombre de Fontaine réfrigérée.....
- Nombre de jacuzzi.....
- De quel type de production s'agit-il ?

### Type de production d'ECS

- Par capteurs solaires
- Par accumulation (ballon - nombre: |\_\_/\_\_/\_\_/\_\_|)
- Semi instantanée (échangeur + ballon < 400 L - nombre: |\_\_/\_\_/\_\_/\_\_|)
- Semi instantanée (échangeur + ballon > 400 L - nombre: |\_\_/\_\_/\_\_/\_\_|)
- Instantanée (échangeur - nombre: |\_\_/\_\_/\_\_/\_\_|)
- Température de l'eau chaude sanitaire en sortie de production :  
.....°C

- Ballons

Avec vanne de vidange en point bas : Oui ☐ Non ☐

Avec accès (trappe de visite) : Oui ☐ Non ☐

Avec purge d'air : Oui ☐ Non ☐

- Changement régulier des périphériques (pompeaux de douches, flexibles, aérateurs, mousseurs...)

• Oui ☐ Non ☐

- Nombre de douches · Individuelles |\_\_|\_\_|\_\_|

- Calorifugeage des canalisations d'ECS

- ✓ · Intégral ☐
- ✓ · Partiel ☐
- ✓ · Inexistant ☐

- Conception du (des) réseau(x) : Votre réseau est-il bouclé ?

Oui, totalement ☐ Oui, partiellement ☐ Non ☐

- Existe-il des traitements complémentaires (adoucisseurs, filtres, filmogènes...) ?

Non ☐ Oui ☐ Si oui, préciser : .....

- ✓ Formation et/ou Nomination d'un responsable de contrôle des Légionelles

Non ☐ Oui ☐

- ✓ Température de l'eau chaude (50° à 80°C)

.....

- ✓ Température de l'eau froide (< 20°C)

- Maintien des robinets ouverts (eau chaude et froide) pendant plusieurs minutes (tous les jours) pour les chambres non occupées

Non ☐ Oui ☐

### III- Source d'eau :

- Distribution publique
- Forage. Existe t il un puits?

- ✓ Propreté des douches.....

- ✓ Propreté des robinets.....

- ✓ Elimination du tartre.....

- ✓ Désinfection du système d'eau chaude avec 50 ppm de chlore pendant 2 à 4 heures après les interventions techniques.....

### IV-Type de traitement (s) installé (s) sur le réseau d'eau froide

- ✓ Filtration ☐

- ✓ Désinfection ☐ Nom du produit : .....

- ✓ Utilisation : continue ☐ discontinue ☐

- ✓ Taux de désinfectant injecté : .....mg/L

- ✓ Taux de désinfectant résiduel : ..... mg/L

✓ **Adoucissement** - Nom du produit : .....

✓ **Filmogène** (*antitartre*, anticorrosion)

– Nom du produit : .....

## V- Données du carnet sanitaires : Mesures de températures :

### • Mesures de paramètres physico-chimiques de l'eau

Oui ☐

Non ☐

Si oui, les quels : .....

✓ TH ☐

✓ pH ☐

✓ Autre (métaux) :

- Désinfectant (chlore, autres....)

### • Existence de dispositifs de protection contre les retours d'eau à l'amont de chaque :

Appareil alimenté par le réseau d'eau chaude sanitaire : Non ☐ Oui ☐

Dispositif de traitement Non ☐ Oui ☐

Mitigeurs Non ☐ Oui ☐

• Mesures de températures Non ☐ Oui ☐

✓ Si oui, avec quelle fréquence ? .....

✓ des points d'usage éloignés.....?

- de la production
- des points d'usage éloignés
- du retour de boucle
- autre : .....

Si oui, fréquence : ..... ;

**VI-Recherches de *Legionella pneumophila* :**Non ☐ Oui ☐

Si oui, fréquence : ..... fois par an

**VII-Site de prélèvement :**

Point d'Usage de ECS ☐ Ballon de stockage ☐  
TAR ☐ Bain ☐ Jacuzzi ☐ Autres ☐

Chambre : ..... Etage:.....

Température de prélèvement : .....

**VIII-Observation :**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ROYAUME DU MAROC  
Ministère du Tourisme  
Direction de la Réglementation,  
du Développement et de la Qualité



المملكة المغربية  
وزارة السياحة  
مديرية التقنين و التطوير و الجودة

10 MARS 2016

A

Madame la Directrice de l'Institut Pasteur du Maroc

**Objet :** Demande d'accès aux structures hôtelières pour la réalisation des prélèvements d'eau

**Réf :** Votre courrier NE/HK/34/16 en date du 09 Février 2016

Madame la directrice,

Faisant suite à votre courrier cité en référence, j'ai l'honneur de vous informer que le Ministère du Tourisme a engagé une réforme ambitieuse du système de classement des établissements d'hébergement touristique visant à améliorer la compétitivité et la qualité des prestations des établissements touristiques et à aligner l'offre touristique nationale sur les standards internationaux en intégrant les meilleures pratiques et en l'adaptant à l'évolution des exigences des touristes en termes de qualité, de sécurité, d'hygiène et de développement durable.

Votre projet s'inscrit parfaitement dans l'esprit de cette réforme. A cet effet, le ministère veillera à contribuer à la réussite de ce projet qui nous permettra d'envisager des pistes de collaboration à même de hisser l'offre touristique nationale.

Dans ce sens, le Ministère du Tourisme sensibilisera les délégations du tourisme des villes concernées par les prélèvements ainsi que la Fédération Nationale de l'Industrie Hôtelière (FNIH) en vue de collaborer avec vos chercheurs et de leur faciliter l'accès aux établissements d'hébergement touristique afin de leur garantir la réalisation de leur mission dans les meilleures conditions. Par conséquent, vous pouvez dès à présent rentrer en contact directement avec nos délégations pour coordination de vos actions.

Enfin, je vous prie d'agréer, Madame la Directrice, l'expression de nos salutations les plus distinguées.

Mehdi TALEB  
Directeur de la Réglementation,  
du Développement et de la Qualité

## ANNEXE 2

Tableau I. Recueil des données du questionnaire établis sur terrain et investigation épidémiologique

Org.	N° Echant.	Ville	N° *	Prlv.	Age réseau	Matériaux les plus utilisés	Type de production	Calorifugeage	Système bouclé	Energie	Adc.	Traitement	T °C	CFU/L	Identification	Code Labo
H1	1	Ville 1	4	ECS	2	PPR/cuiv / PEX	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	44	2000	LP sg2-15	A1
	2												47	0	-	-
H2	3	Ville 1	5	ECS	8	PEX	ACL/IST	Intégral	Oui	Solaire	Oui	Oui	47	0	-	-
H3	4	Ville 1	4	ECS	18	PPR/ Cuiv / Galva	IST	Intégral	RAS	Gaz	Oui	RAS	38	300	LP sg2-15	A4
	5												45	20000	LP sg1	A5
H4	6	Ville 1	4	ECS	2	PPR/ Cuiv / Galva	ACL/IST	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	46	1200	LP sg2-15	A6
H5	7	Ville 1	5	ECS	5	PPR	ACL/IST	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	41	250	LP sg2-15	A7
H6	8	Ville 1	4	ECS	2	PPR/Cuiv/Galv	ACL/IST	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	50	500	LP sg2-15	A8
	9												42	0	-	-
H7	10	Ville 2	4	ECS	5	PEX/Cuivr	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	36	1200	LP sg2-15	M10
H8	11	Ville 3	5	ECS	25	Galva/PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	42	150	LP sg2-15	Z11
H9	12	Ville 3	4	ECS	15	Galva/PEX	ACL/IST	Intégral	RAS	Electrique	RAS	RAS	42	17000	LP sg2-15	Z12
H10	13	Ville 3	4	ECS	20	Galva/Cuiv	ACL	Intégral	Oui	Elec/slr	RAS	Oui	38	1200	LP sg1	Z13
	14												37	12000	LP sg1	Z14
H11	15	Ville 3	4	ECS	26	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	42	14000	LP sg2-15	Z15
H12	16	Ville 3	4	ECS	19	PVC	ACL	Intégral	RAS	Elec/slr	RAS	RAS	50	0	-	-
H13	17	Ville 3	4	ECS	13	Galva	ACL	Intégral	Oui	Elec/slr	RAS	RAS	37	0	-	-
H14	18	Ville 2	4	ECS	7	PPR/Galva	ACL	Intégral	Oui	Elec/slr	Oui	Oui	40,1	3500	LP sg2-15	M18
	19												41	30 000	LP sg2-15	M19
H15	20	Ville 2	4	ECS	5	PPR	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	Oui	51	0	-	-
H16	21	Ville 2	4	ECS	5	PPR	ACL	Intégral	Oui	GAS	Oui	RAS	55	0	-	-

Org.	N° Echant.	Ville	N° *	Priv.	Age réseau	Matériaux les plus utilisés	Type de production	Calorifugeage	Système bouclé	Energie	Adc.	Traitement	T °C	CFU/L	Identification	Code Labo
H17	22	Ville 4	4	ECS	16	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	30	1250	LP sg2-15	F22
	23												50	0	-	-
H18	24	Ville 4	3	ECS	9	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	47	0	-	-
H19	25	Ville 4	5	ECS	2	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	40	0	-	-
H20	26	Ville 4	4	ECS	17	Galva	ACL	Partiel	Oui	Fioul	Oui	RAS	40	4700	LP sg2-15	F26
H21	27	Ville 1	4	ECS	15	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	46	100	LP sg2-15	A27
	28												47	20000	LP sg2-15	A28
H22	29	Ville 1	4	ECS	2	PPR/cuiv/galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	47	9250	LP sg2-15	A29
H23	30	Ville 1	4	ECS	8	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	RAS	RAS	39,5	2750	LP sg2-15	A30
H24	31	Ville 1	4	ECS	10	Galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul/Sol	Oui	RAS	46	2500	LP sg1	A31
H25	32	Ville 1	4	ECS	22	PPR/Inox	ACL	Partiel	Oui	Fioul/Gaz	RAS	RAS	40	750	LP sg2-15	A32
	33												39	0	-	-
H26	34	Ville 1	3	ECS	11	PPR/Galva	ACL/IST	Intégral	Oui	Gaz/Sol	RAS	Oui	49	4000	LP sg2-15	A34
	35												21	0	-	-
H27	36	Ville 1	4	ECS	11	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	55	0	-	-
H28	37	Ville 2	4	ECS	10	PPR/Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	50	100	LP sg2-15	M37
H29	38	Ville 2	4	ECS	10	PPR/Galva	ACL	Partiel	Oui	Gaz	RAS	RAS	45	0	-	-
	39												46	0	-	-
H30	40	Ville 2	4	ECS	22	PPR/Galva	ACL	Intégral	Oui	Charbon	Oui	RAS	44,6	0	-	-
H31	41	Ville 2	4	ECS	16	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	35	75000	LP sg2-15	M41
H32	42	Ville 5	4	ECS	4	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	41	75000	LP sg1	T42
H33	43	Ville 5	5	ECS	15	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	39	60000	LP sg1	T43
	44					PPR							38	60000	LP sg1	T44
H34	45	Ville 5	3	ECS	4	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	50	0	-	-
H35	46	Ville 5	4	ECS	3	PPR/Galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	50,5	2500	LP sg2-15	T46
H36	47	Ville 3	5	ECS	10	PPR	ACL	Intégral	Oui	Electrique	RAS	RAS	47	0	-	-

Org.	N° Echant.	Ville	N° *	Priv.	Age réseau	Matériaux les plus utilisés	Type de production	Calorifugeage	Système bouclé	Energie	Adc.	Traitement	T °C	CFU/L	Identification	Code Labo
H37	48	Ville 3	3	ECS	9	PEX-C	IST	Partiel	RAS	Solaire	RAS	RAS	65	0	-	-
H38	49	Ville 3	3	ECS	14	Galva	ACL	Partiel	Oui	Solaire	RAS	RAS	60	0	-	-
H39	50	Ville 3	3	ECS	12	PPR/Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	50	30000	LP sg2-15	Z50
	51												46	29000	LP sg2-15	Z51
H40	52	Ville 3	4	ECS	7	Galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	54	6 000	LP sg2-15	Z52
H41	53	Ville 1	5	ECS	8	PVC	ACL	Intégral	Oui	Elec/Slr	Oui	RAS	50,6	22000	LP sg2-15	A53
H42	54	Ville 1	5	ECS	10	PPR/Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	44	350	LP sg1	A54
H43	55	Ville 1	5	ECS	4	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	54	0	-	-
H44	56	Ville 1	5	ECS	12	PPR/Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	38	0	-	-
H45	57	Ville 1	4	ECS	10	Galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul/Sol	Oui	RAS	46	2500	LP sg1/lp 2-15	A57
H46	58	Ville 4	5	ECS	5	PPR/Galva/cuiv	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	49	0	-	-
	59												46	0	-	-
H47	60	Ville 4	5	ECS	2	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	45	0	-	-
H48	61	Ville 4	4	ECS	16	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	55	0	-	-
H49	62	Ville 4	5	ECS	7	PVC	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	42	1400	LP sg2-15	F62
H50	63	Ville 2	4	ECS	10	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	51	0	-	-
H51	64	Ville 2	5	ECS	2	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	54	0	-	-
H52	65	Ville 2	4	ECS	25	PPR	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	41	6 000	LP sg2-15	M65
H53	66	Ville 2	4	ECS	5	PPR Galva	ACL/IST	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	30	0	-	-
H54	67	Ville 1	4	ECS	4	PVC	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	41	1200	LP sg2-15	A67
H55	68	Ville 1	4	ECS	13	PPR	ACL	Partiel	Oui	Gaz	Oui	RAS	42	0	-	-
H56	69	Ville 1	3	ECS	8	PPR	ACL	Partiel	RAS	Fioul	RAS	RAS	41	2 000	LP sg2-15	A69
H57	70	Ville 8	5	ECS	5	Galva	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	Oui	45	0	-	-
H58	71	Ville 6	3	ECS	14	PEX	ACL	Intégral	Oui	Gas	RAS	RAS	45,3	0	-	-
H59	72	Ville 6	3	ECS	8	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	RAS	RAS	59	0	-	-
H60	73	Ville 6	3	ECS	6	Galva	ACL	Intégral	Oui	Elec/Slr	RAS	RAS	40	0	-	-
H61	74	Ville 6	3	ECS	16	Galva	ACL	Intégral	Oui	Electrique	RAS	RAS	50	0	-	-



Org.	N° Echant.	Ville	N° *	Priv.	Age réseau	Matériaux les plus utilisés	Type de production	Calorifugeage	Système bouclé	Energie	Adc.	Traitement	T °C	CFU/L	Identification	Code Labo
H62	75	Ville 6	4	ECS	11	Galva/Inox	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	46	0	-	-
H63	76	Ville 6	3	ECS	9	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	42	12000	LP sg2-15	D76
H64	77	Ville 6	4	ECS	12	PEX	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	35	750	LP sg1	D77
H65	78	Ville 6	4	ECS	8	PEX/PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	38	1200	LP sg1	D78
H66	79	Ville 6	3	ECS	13	PVC/Galva	ACL	Partiel	Oui	Elec/Slr	RAS	RAS	45,3	15000	LP sg2-15	D79
H67	80	Ville 6	4	ECS	13	PPR/PVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	36	0	-	-
H68	81	Ville 7	5	ECS	5	PPR/PVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	48	5400	LP sg2-15	C81
H69	82	Ville 7	5	ECS	26	Galva/PPR	ACL/IST	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	55	0	-	-
H70	83	Ville 7	4	ECS	16	Galva/PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul/Elec	RAS	RAS	30,5	0	-	-
H71	84	Ville 7	5	ECS	4	PEX	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	53	6000	LP sg2-15	C84
H72	85	Ville 7	5	ECS	7	PPR/Galva/Inox	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	Oui	56	300	LP sg2-15	C85
H73	86	Ville 7	5	ECS	3	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	54	0	-	-
H74	87	Ville 7	4	ECS	26	PPR/Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	46	20000	LP sg1	C87
H75	88	Ville 7	4	ECS	11	PEX	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	47	0	-	-
	89												32	0	-	-
H76	90	Ville 7	5	ECS	5	Galva/PVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	52	3500	LP sg2-15	C90
	91												42	25000	LP sg2-15	C91
H77	92	Ville 7	4	ECS	8	Galva	IST	Partiel	RAS	Electrique	Oui	Oui	69	0	-	-
H78	93	Ville 7	5	ECS	11	CPVC/Inox	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	38	15000	LP sg2-15/LP sg1	C93
H79	94	Ville 7	5	ECS	7	Galva/Inox	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	43	1200	LP sg1	C94
H80	95	Ville 7	4	ECS	13	PEX	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	43	30000	LP sg2-15	C95
H81	96	Ville 7	3	ECS	11	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	57	0	-	-
H82	97	Ville 7	4	ECS	13	CPVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	45	0	-	-
	98												55	0	-	-
H83	99	Ville 7	4	ECS	2	PVC	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	46	1000	LP sg1	C99
H84	100	Ville 7	4	ECS	14	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	42	0	-	-

Org.	N° Echant.	Ville	N° *	Priv.	Age réseau	Matériaux les plus utilisés	Type de production	Calorifugeage	Système bouclé	Energie	Adc.	Traitement	T °C	CFU/L	Identification	Code Labo
H85	101	Ville 7	3	ECS	18	PPR/PVC	ACL/IST	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	41,6	50000	LP sg2-15	C101
H86	102	Ville 7	4	ECS	13	CPVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	45,2	10000	LP sg1	C102
H87	103	Ville 7	5	ECS	13	CPVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	45	0	-	-
H88	104	Ville 7	5	ECS	3	Galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	44,3	25000	LP sg2-15	C104
	105												43	16000	LP sg2-15	C105
H89	106	Ville 7	4	ECS	18	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	RAS	Oui	48,4	5000	LP sg1	C106
H90	107	Ville 7	4	ECS	9	PVC	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	44,4	17500	LP sg1	C107
H91	108	Ville 2	4	ECS	9	PEX	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	42,6	0	-	-
H92	109	Ville 9	3	ECS	17	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	43,4	0	-	-
H93	110	Ville 7	4	ECS	11	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	42	0	-	-
	111												41	0	-	-
H94	112	Ville 9	3	ECS	10	PPR	ACL	Intégral	Oui	Electrique	RAS	RAS	43	0	-	-
H95	113	Ville 2	4	ECS	14	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	44	0	-	-
	114												43	0	-	-
H96	115	Ville 3	4	ECS	9	PEX	ACL	Intégral	Oui	Elec/Slr	Oui	RAS	41	50000	LP sg2-15	Z115
H97	116	Ville 1	4	ECS	12	Galva	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	Oui	40,2	100	LP sg2-15	A116
	117												42	2500	LP sg1	A117
H98	118	Ville 1	4	ECS	11	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	43	0	-	-
H99	119	Ville 8	4	ECS	10	PPR/Inox	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	39,8	0	-	-
	120			ECS									42	0	-	-
H100	121	Ville 1	4	ECS	18	Galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul	RAS	RAS	38,4	2800	LP sg1	A121
	122												41	1000	LP sg1	A122
H101	123	Ville 3	3	ECS	18	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	43	0	-	-
	124												42,9	9000	LP sg1	Z124
H102	125	Ville 2	4	ECS	12	PVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	41	0	-	-
	126												40	1500	LP sg2-15	-
H103	127	Ville 8	4	ECS	11	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	41	0	-	-
	128												43	1250	LP sg1	R128

Org.	N° Echant.	Ville	N° *	Priv.	Age réseau	Matériaux les plus utilisés	Type de production	Calorifugeage	Système bouclé	Energie	Adc.	Traitement	T °C	CFU/L	Identification	Code Labo
H104	129	Ville 5	4	ECS	14	Galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	47	1250	LP sg2-15	T129
H105	130	Ville 8	4	ECS	13	Galva	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	40,7	0	-	-
	131												41	16000	LP sg2-15	R131
H106	132	Ville 8	4	ECS	6	PVC	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	42,5	1000	LP sg1	R132
H107	133	Ville 1	4	ECS	18	PPR	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	43	0	-	-
H108	134	Ville 1	4	ECS	4	PVC	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	Oui	42,6	0	-	-
H109	135	Ville 1	4	ECS	16	PVC	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	RAS	55	0	-	-
	136												51,6	6000	Lp sg2-15	A136
H110	137	Ville 1	4	ECS	9	Galva	ACL	Partiel	Oui	Fioul	Oui	Oui	52,8	25000	Lp sg2-15	A137
H111	138	Ville 1	4	ECS	13	Galva	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	49,7	7500	Lp sg2-15	A138
H112	139	Ville 1	4	ECS	7	PPR	ACL	Intégral	Oui	Gaz	RAS	RAS	58	0	-	-
	140												42,9	2500	Lp sg2-15	A140
H113	141	Ville 1	4	ECS	19	Galva	ACL	Intégral	Oui	Fioul	Oui	Oui	44,2	11000	Lp sg2-15	A141
H114	142	Ville 5	4	ECS	11	PPR	ACL	Intégral	Oui	Electrique	Oui	RAS	47,7	250	Lp sg2-15	T142
H115	143	Ville 8	4	ECS	10	PVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	Oui	40,8	0	-	-
	144												43,2	0	-	-
H116	145	Ville 3	4	ECS	13	Galva	ACL	Intégral	Oui	Elec/Slr	Oui	RAS	44	20000	LP sg2-15	Z145
H117	146	Ville 2	4	ECS	12	Galva	ACL	Intégral	Oui	Elec/Slr	Oui	Oui	41	0	-	-
	147												42,6	0	-	-
H118	148	Ville 8	4	ECS	11	PVC	ACL	Intégral	Oui	Gaz	Oui	RAS	46	0	-	-
	149												48	0	-	-

**ACL** : Accumulation  
**ACL/IST** : Accumulation et Instantanée  
**IST** : Instantanée  
**Elec/slr** : Electrique et Solaire  
**Fioul/Elec** : Fioul et Electrique

- **H** : Hotels
- **ECS** : Eau chaude sanitaire
- **Lp sg1** : *L. pneumophila* séro groupe 1
- **Lp sg 2-15** : *L. pneumophila* séro groupe 2-15
- **RAS** : Rien à signaler
- **Prl.** : Prélèvement
- **Adc.** : Adoucisseur

- **Galva** : Acier galvanisé
- **PPR** : Polypropylène,
- **PVC** : chlorure de Polyvinyle,
- **PEX-c** : Polyéthylène réticulé,
- **CPVC** : Polychlorure de vinyle surchloré
- **Inox** : Acier Inoxydable
- **Cuiv** : Cuivre

## ANNEXE 3

### Résultats de la caractérisation physicochimique de la surface bactérienne de 40 souches de *L. pneumophila* par l'angle de contact

**Tableau I.** Les valeurs de l'angles de contact avec l'écart-type (°), les valeurs d'énergie de surface avec l'écart type (mJ m<sup>-2</sup>) de 10 souches de *L. pneumophila* sg 1.

Bactéries	Angle de contact (°)			Composantes de l'énergie libre d'interaction (mJ/m <sup>2</sup> )				
	Eau	Formamide	Diidomethane	$\gamma^{LW}$	$\gamma^-$	$\gamma^+$	$\gamma_{ab}$	$\Delta G_{iWi}$
LA 1	42,6 (1,5)	51,4 (0,9)	83,2 (1,8)	15,85	48,88	3,53	26,28	23,68
LA 2	45,1 (1,7)	35,7 (2,1)	110,9 (2,2)	5,24	22,99	29,32	51,93	-10,95
LA 3	82,5 (1,9)	74,4 (1,8)	68,2 (2,02)	23,83	0,04	12,11	1,33	-30,60
LA 4	66,7 (1,5)	36,8 (1,5)	101,9 (2,02)	7,99	23,88	6,71	25,31	-8,40
LA 5	68,3 (1,5)	14,6 (1,5)	54,7 (2,02)	31,55	9,83	2,52	9,95	-28,32
LA 6	72,2 (1,5)	23,7 (1,5)	87,8 (2,02)	13,67	24,06	1,26	11,00	-4,16
LA 7	78,3 (1,5)	42,5 (1,5)	98,2 (2,02)	9,32	22,18	1,36	10,99	-10,51
LA 8	51,3 (1,5)	44,3 (1,5)	81,2 (2,02)	16,85	6,56	29,13	27,64	2,82
LA 9	46,5 (1,5)	32,3 (1,5)	69,7 (2,02)	22,99	6,28	27,81	26,42	2,24
LA 10	69,3 (1,5)	44,3 (1,5)	112,5 (2,02)	4,83	26,02	7,02	27,03	-11,72

$\gamma^{LW}$ : The Lifshitz-Van der Waals components of the surface tension.  $\gamma^-$ : electron donor components of the surface tension.  $\gamma^+$ : electron acceptor components of the surface tension.  $\gamma^{LW}$ : the Lewis acid-base surface tension component.  $\Delta G_{iWi}$ : the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water. Lpn: *L. pneumophila*

**Tableau II.** Les valeurs de l'angles de contact avec l'écart-type (°), les valeurs d'énergie de surface avec l'écart type (mJ m<sup>-2</sup>) de 30 souches de *L. pneumophila* sg 2-15.

Bactéries	Angle de contact (°)			Composantes de l'énergie libre d'interaction (mJ/m <sup>2</sup> )				
	Eau	Formamide	Diidomethane	$\gamma^{LW}$	$\gamma^-$	$\gamma^+$	$\gamma_{ab}$	$\Delta G_{iwi}$
LB 1	38,3 (1,9)	28,40 (1,9)	66,30 (1,9)	24,91	5,28	35,96	27,56	10,22
LB 2	37,8 (1,9)	32,30 (1,9)	59,40 (1,9)	28,86	2,86	39,57	21,29	15,67
LB 3	66,30 (1,9)	23,43 (1,9)	71,34 (1,9)	11,57	0,40	22,08	5,96	-7,49
LB 4	41,2 (1,9)	32,30 (1,9)	57,30 (1,9)	30,07	2,77	35,31	19,79	10,76
LB 5	71,43 (1,9)	39,70 (1,9)	98,30 (1,9)	9,28	17,29	12,46	29,36	-10,69
LB 6	69,50 (1,9)	39,56 (1,9)	77,18 (1,9)	8,94	0,35	18,92	5,15	-9,78
LB 7	73,76 (1,9)	52,68 (1,9)	99,71 (1,9)	11,78	0,28	8,76	3,13	-14,48
LB 8	43,46 (1,9)	33,68 (1,9)	77,10 (1,9)	18,96	7,76	32,10	31,56	5,39
LB 9	52,5 (1,9)	39,20 (1,9)	73,10 (1,9)	21,11	6,06	24,27	24,25	-1,29
LB 10	34,80 (1,9)	28,30 (1,9)	69,50 (1,9)	23,10	5,79	39,95	30,42	13,40
LB 11	40,10 (1,9)	20,30 (1,9)	78,40 (1,9)	18,28	11,68	29,07	36,85	1,93
LB 12	65,81 (1,9)	24,76 (1,9)	76,32 (1,9)	12,74	0,41	19,38	5,64	-6,49
LB 13	71,40 (1,9)	45,81 (1,9)	84,31 (1,9)	9,05	0,32	15,31	4,42	-11,15
LB 14	62,78 (1,9)	28,65 (1,9)	69,21 (1,9)	9,05	0,46	23,27	6,52	-4,64
LB 15	43,40 (1,9)	25,70 (1,9)	58,10 (1,9)	29,61	4,43	28,69	22,54	2,42
LB 16	65,60 (1,9)	33,65 (1,9)	73,20 (1,9)	21,06	9,12	17,97	25,61	-6,59
LB 17	71,43 (1,9)	39,70 (1,9)	98,30 (1,9)	9,28	17,29	12,46	29,36	-10,69
LB 18	45,40 (1,9)	21,30 (1,9)	53,70 (1,9)	32,12	6,06	42,14	31,96	12,93
LB 19	38,40 (1,9)	19,35 (1,9)	61,82 (1,9)	38,40	19,35	61,82	38,40	19,35
LB 20	58,32 (1,9)	26,87 (1,9)	88,49 (1,9)	14,50	0,53	13,35	5,30	-2,47
LB 21	68,47 (1,9)	44,56 (1,9)	71,39 (1,9)	5,75	0,37	22,05	5,69	-8,50
LB 22	75,53 (1,9)	49,28 (1,9)	89,98 (1,9)	10,25	0,25	12,68	3,56	-14,97
LB 23	67,59 (1,9)	39,86 (1,9)	78,97 (1,9)	9,02	0,38	17,99	5,24	-7,73
LB 24	42,30 (1,9)	12,60 (1,9)	55,20 (1,9)	31,27	7,00	44,29	35,22	13,73
LB 25	70,69 (1,9)	41,97 (1,9)	101,34 (1,9)	18,42	0,33	8,18	3,29	-10,88
LB 26	69,76 (1,9)	50,42 (1,9)	113,04 (1,9)	17,62	0,35	4,69	2,55	-15,69
LB 27	68,12 (1,9)	47,71 (1,9)	103,85 (1,9)	15,10	0,37	7,33	3,30	-10,35
LB 28	61,56 (1,9)	44,23 (1,9)	96,54 (1,9)	11,98	0,48	9,95	4,35	-4,48
LB 29	62,41 (1,9)	42,84 (1,9)	94,90 (1,9)	12,08	0,46	10,64	4,44	-5,06
LB 30	65,81 (1,9)	37,28 (1,9)	88,35 (1,9)	12,80	0,41	13,41	4,69	-6,71

## ANNEXE 4

### Résultats de l'adhésion prédictive de 40 souches de *L. pneumophila* sur les différents supports

Bact.	Acier galvanisé			Acier inoxydable			Cuivre			Verre		
	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{TOT}$	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{TOT}$	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{TOT}$	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{TOT}$
LA 1	-1,63	6,61	4,98	2,21	2,51	4,72	0,24	9,44	9,68	2,11	-29,10	-26,98
LA 2	-5,77	-0,97	-6,75	7,81	-0,58	7,23	0,84	-1,39	-0,55	7,48	3,43	10,91
LA 3	0,57	-36,21	-35,64	-0,77	-51,87	-52,64	-0,08	-50,53	-50,61	-0,74	0,69	-0,05
LA 4	-4,46	-6,22	-10,67	6,03	-13,31	-7,28	0,65	-8,53	-7,88	5,78	-18,23	-12,46
LA 5	2,37	-20,20	-17,83	-3,21	-34,13	-37,34	-0,34	-28,01	-28,36	-3,08	-21,29	-24,36
LA 6	-2,33	-9,14	-11,47	3,15	-20,19	-17,04	0,34	-12,52	-12,19	3,01	-29,41	-26,40
LA 7	-3,90	-10,38	-14,28	5,28	-21,77	-16,49	0,57	-14,26	-13,69	5,06	-28,57	-23,52
LA 8	-1,33	-16,19	-17,52	1,80	-21,08	-19,28	0,19	-22,65	-22,46	1,72	9,10	10,82
LA 9	0,36	-16,82	-16,46	-0,49	-22,18	-22,66	-0,05	-23,53	-23,58	-0,47	8,31	7,84
LA 10	-6,00	-4,64	-10,64	8,11	-11,06	-2,95	0,87	-6,33	-5,46	7,77	-18,34	-10,57
LB 1	0,84	-16,73	-15,89	-1,14	-20,60	-21,74	-0,12	-23,45	-23,58	-1,09	14,33	13,24
LB 2	1,77	-20,24	-18,47	-2,40	-24,74	-27,14	-0,26	-28,38	-28,64	-2,30	18,14	15,84
LB 3	-3,05	-30,74	-33,79	4,12	-42,06	-37,94	0,44	-42,96	-42,52	3,95	8,82	12,77
LB 4	2,05	-21,15	-19,10	-2,77	-26,66	-29,42	-0,30	-29,63	-29,92	-2,65	15,57	12,91
LB 5	-3,92	-9,22	-13,14	5,30	-15,45	-10,15	0,57	-12,78	-12,22	5,08	-9,21	-4,13
LB 6	-4,06	-31,75	-35,81	5,49	-44,11	-38,63	0,59	-44,34	-43,75	5,26	6,27	11,53
LB 7	-2,98	-35,06	-38,03	4,02	-51,36	-47,34	0,43	-48,88	-48,45	3,86	-4,11	-0,25
LB 8	-0,72	-14,10	-14,82	0,97	-17,74	-16,76	0,10	-19,76	-19,66	0,93	10,56	11,49
LB 9	-0,13	-17,84	-17,97	0,18	-24,25	-24,07	0,02	-24,94	-24,92	0,17	5,79	5,96
LB 10	0,39	-15,32	-14,93	-0,53	-18,06	-18,58	-0,06	-21,50	-21,56	-0,50	16,51	16,01
LB 11	-0,91	-10,38	-11,29	1,23	-13,28	-12,04	0,13	-14,53	-14,40	1,18	6,83	8,02
LB 12	-2,64	-13,56	-16,20	3,57	-43,41	-39,85	0,38	-18,67	-18,29	3,42	6,55	9,97
LB 13	-4,01	-17,04	-21,05	5,43	-46,45	-41,02	0,58	-23,53	-22,95	5,20	3,03	8,23
LB 14	-4,01	-10,61	-14,63	5,43	-41,04	-35,62	0,58	-14,55	-13,97	5,20	9,65	14,85
LB 15	1,94	-4,03	-2,09	-2,63	-25,45	-28,07	-0,28	-5,45	-5,73	-2,52	9,98	7,46
LB 16	-0,14	-9,72	-9,87	0,19	-22,45	-22,25	0,02	-13,46	-13,44	0,19	-0,87	-0,69
LB 17	-3,92	-12,18	-16,10	5,30	-15,45	-10,15	0,57	-16,97	-16,40	5,08	-9,21	-4,13
LB 18	2,50	4,42	6,92	-3,38	-16,73	-20,10	-0,36	6,35	5,99	-3,24	17,66	14,43
LB 19	3,79	17,76	21,55	-5,13	7,56	2,44	-0,55	24,87	24,32	-4,91	23,03	18,11
LB 20	-2,06	-18,46	-20,52	2,78	-46,21	-43,43	0,30	-25,53	-25,23	2,66	0,64	3,30
LB 21	-5,51	-11,63	-17,14	7,45	-42,30	-34,85	0,80	-15,97	-15,17	7,14	8,86	15,99
LB 22	-3,54	-19,57	-23,11	4,79	-48,74	-43,95	0,51	-27,06	-26,55	4,59	0,53	5,12
LB 23	-4,03	-14,70	-18,73	5,44	-44,41	-38,96	0,58	-20,26	-19,68	5,22	5,39	10,60
LB 24	2,31	5,91	8,23	-3,13	-14,26	-17,39	-0,33	8,43	8,09	-3,00	18,42	15,43
LB 25	-0,87	-24,17	-25,05	1,18	-51,43	-50,25	0,13	-33,50	-33,38	1,13	-4,98	-3,85
LB 26	-1,10	-28,86	-29,96	1,49	-54,60	-53,12	0,16	-40,05	-39,89	1,43	-10,29	-8,87
LB 27	-1,86	-25,14	-27,01	2,52	-51,85	-49,33	0,27	-34,86	-34,59	2,42	-6,23	-3,81
LB 28	-2,90	-21,93	-24,83	3,93	-48,93	-45,00	0,42	-30,37	-29,95	3,76	-3,06	0,71
LB 29	-2,87	-21,23	-24,10	3,88	-48,55	-44,67	0,42	-29,39	-28,98	3,72	-2,20	1,52
LB 30	-2,62	-18,59	-21,21	3,54	-46,97	-43,43	0,38	-25,70	-25,32	3,39	0,93	4,32

Bact.	PVC			PEX-C			PPR		
	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{TOT}$	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{TOT}$	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{TOT}$
LA 1	-1,66	2,15	0,50	2,06	3,36	5,43	0,63	-9,44	-8,81
LA 2	-5,86	-0,46	-6,32	7,31	-0,69	6,62	2,23	0,78	3,01
LA 3	0,58	-37,39	-36,81	-0,73	-54,18	-54,90	-0,22	-61,04	-61,26
LA 4	-4,53	-9,38	-13,90	5,64	-13,43	-7,79	1,72	-23,51	-21,79
LA 5	2,41	-24,35	-21,94	-3,00	-35,10	-38,10	-0,92	-49,44	-50,36
LA 6	-2,36	-14,21	-16,57	2,94	-20,33	-17,39	0,90	-36,42	-35,52
LA 7	-3,97	-15,35	-19,32	4,94	-22,00	-17,06	1,51	-37,93	-36,42
LA 8	-1,35	-15,30	-16,65	1,68	-22,24	-20,56	0,51	-21,04	-20,53
LA 9	0,37	-16,08	-15,71	-0,46	-23,37	-23,82	-0,14	-22,68	-22,82
LA 10	-6,09	-7,76	-13,85	7,59	-11,08	-3,49	2,32	-20,90	-18,59
LB 1	0,85	-15,02	-14,16	-1,06	-21,88	-22,94	-0,32	-18,25	-18,57
LB 2	1,80	-18,04	-16,24	-2,24	-26,29	-28,54	-0,69	-21,51	-22,20
LB 3	-3,10	-30,42	-33,52	3,86	-44,14	-40,28	1,18	-45,97	-44,79
LB 4	2,08	-19,39	-17,32	-2,59	-28,23	-30,82	-0,79	-24,88	-25,67
LB 5	-3,98	-11,03	-15,01	4,96	-15,90	-10,94	1,51	-22,20	-20,69
LB 6	-4,12	-31,87	-35,99	5,14	-46,22	-41,08	1,57	-49,48	-47,92
LB 7	-3,02	-36,97	-39,99	3,77	-53,52	-49,76	1,15	-62,48	-61,33
LB 8	-0,73	-12,91	-13,64	0,91	-18,79	-17,88	0,28	-16,47	-16,19
LB 9	-0,13	-17,54	-17,68	0,16	-25,46	-25,30	0,05	-26,20	-26,15
LB 10	0,39	-13,21	-12,81	-0,49	-19,27	-19,77	-0,15	-14,31	-14,46
LB 11	-0,93	-9,65	-10,57	1,15	-14,04	-12,88	0,35	-12,78	-12,43
LB 12	-2,68	-19,16	-21,84	3,34	-27,49	-24,15	1,02	-48,54	-47,52
LB 13	-4,08	-22,65	-26,73	5,08	-32,55	-27,47	1,55	-53,63	-52,08
LB 14	-4,08	-16,24	-20,32	5,08	-23,25	-18,18	1,55	-44,42	-42,86
LB 15	1,97	-7,91	-5,93	-2,46	-11,26	-13,72	-0,75	-25,83	-26,58
LB 16	-0,15	-12,21	-12,36	0,18	-17,58	-17,40	0,06	-26,92	-26,86
LB 17	-3,98	-13,07	-17,05	4,96	-18,91	-13,94	1,51	-22,20	-20,69
LB 18	2,54	0,81	3,35	-3,16	1,37	-1,79	-0,96	-12,25	-13,21
LB 19	3,85	16,42	20,27	-4,80	23,89	19,09	-1,47	18,77	17,30
LB 20	-2,09	-23,82	-25,91	2,60	-34,26	-31,66	0,79	-54,37	-53,57
LB 21	-5,59	-17,33	-22,92	6,97	-24,82	-17,85	2,13	-46,24	-44,11
LB 22	-3,60	-25,20	-28,80	4,48	-36,25	-31,77	1,37	-57,41	-56,04
LB 23	-4,09	-20,30	-24,39	5,09	-29,15	-24,06	1,56	-50,21	-48,65
LB 24	2,35	2,51	4,86	-2,93	3,83	0,91	-0,89	-9,00	-9,90
LB 25	-0,88	-29,59	-30,47	1,10	-42,63	-41,52	0,34	-62,93	-62,60
LB 26	-1,12	-34,13	-35,25	1,39	-49,22	-47,82	0,43	-68,96	-68,53
LB 27	-1,89	-30,49	-32,38	2,36	-43,93	-41,57	0,72	-63,97	-63,24
LB 28	-2,95	-27,24	-30,19	3,68	-39,23	-35,55	1,12	-59,16	-58,04
LB 29	-2,91	-26,58	-29,49	3,63	-38,27	-34,63	1,11	-58,34	-57,23
LB 30	-2,66	-24,06	-26,72	3,31	-34,60	-31,29	1,01	-55,14	-54,13

## ANNEXE 5

### Résultats de l'effet du chlore sur la survie de *L. pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm

**Tableau I.** Survie de la souche *L. pneumophila* sg 2-15 dans l'eau du robinet stérile en présence et en absence du chlore à différentes concentrations

Jours/[Chlore]	0 mg/l	0.2 mg/l	0.3 mg/l	0.4 mg/l	0.5 mg/l
3	5,079	4,957	4,975	4,944	4,895
6	5,057	4,872	4,910	4,835	4,709
12	5,127	5,001	4,725	4,871	4,676
18	5,255	4,988	4,710	4,916	4,734
24	5,204	4,917	4,827	4,719	4,554
30	5,279	5,051	4,952	4,809	4,534

**Tableau II.** Survie de la souche *L. pneumophila* sg 2-15 dans le milieu BYE en présence et en absence du chlore à différentes concentrations

Jours/[Chlore]	0 mg/l	0.2 mg/l	0.3 mg/l	0.4 mg/l	0.5 mg/l
3	5,189	5,129	5,060	4,942	4,835
6	5,608	5,218	5,085	4,680	5,095
12	5,980	4,995	5,163	5,011	5,021
18	6,252	4,927	4,989	5,099	4,989
24	6,357	5,011	5,051	4,991	4,882
30	6,439	5,244	5,172	5,059	5,011



**Tableau III.** Survie de la souche *L. pneumophila* sg 1 dans l'eau du robinet stérile en présence et en absence du chlore à différentes concentrations

Jours/[Chlore]	0 mg/l	0.2 mg/l	0.3 mg/l	0.4 mg/l	0.5 mg/l
3	5,079	4,958	4,975	4,944	4,895
6	5,058	4,872	4,911	4,836	4,709
12	5,128	5,002	4,726	4,871	4,677
18	5,256	4,989	4,710	4,916	4,734
24	5,204	4,917	4,827	4,720	4,554
30	5,279	5,051	4,953	4,810	4,534

**Tableau IV.** Survie de la souche *L. pneumophila* sg 1 dans le milieu BYE en présence et en absence du chlore à différentes concentrations

Jours/[Chlore]	0 mg/l	0.2 mg/l	0.3 mg/l	0.4 mg/l	0.5 mg/l
3	5,194	4,979	4,880	4,953	4,882
6	5,162	4,762	4,512	4,955	4,812
12	6,060	4,680	4,874	4,750	4,744
18	6,244	5,011	4,989	4,406	4,719
24	6,018	4,991	5,323	4,816	4,812
30	6,271	4,877	5,070	4,874	4,810

**Tableau V.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg1 formé sur l'acier galvanisé après traitement le 18<sup>ème</sup>.

Jours/[Chlore]	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	150 mg/l	200 mg/l
3	4,079	4,079	4,079	4,079	4,079
6	4,788	4,788	4,788	4,788	4,788
12	4,524	4,524	4,524	4,524	4,524
18	4,946	4,946	4,946	4,946	4,946
24	5,820	4,658	4,389	4,011	3,778
30	6,279	4,512	4,750	4,363	3,867
36	6,344	5,535	4,903	5,001	4,699
45	6,992	5,608	5,301	5,485	4,904

**Tableau VI.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg 2-15 formé sur l'acier galvanisé après traitement le 18<sup>ème</sup> jour.

Jours/[Chlore]	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	150 mg/l	200 mg/l
3	4,643	4,643	4,643	4,643	4,643
6	5,014	5,014	5,014	5,014	5,014
12	5,302	5,302	5,302	5,302	5,302
18	5,036	5,036	5,036	5,036	5,036
24	5,696	4,955	4,871	4,720	4,394
30	5,977	4,876	5,090	4,605	4,497
36	6,877	5,308	4,994	4,895	4,872
45	7,099	5,792	5,655	5,010	4,991

**Tableau VII.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg1 formé sur l'acier galvanisé après traitement le 30<sup>ème</sup>.

Jours/[Chlore]	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	150 mg/l	200 mg/l
3	4,079	4,079	4,079	4,079	4,079
6	4,788	4,788	4,788	4,788	4,788
12	4,524	4,524	4,524	4,524	4,524
18	4,946	4,946	4,946	4,946	4,946
24	5,820	5,820	5,820	5,820	5,820
30	6,279	6,279	6,279	6,279	6,279
36	6,344	4,989	4,750	4,618	4,011
45	6,992	5,304	4,954	4,872	4,719

**Tableau VIII.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg 2-15 formé sur l'acier galvanisé après traitement le 30<sup>ème</sup> jour.

Jours/[Chlore]	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	150 mg/l	200 mg/l
3	4,643	4,643	4,643	4,643	4,643
6	5,014	5,014	5,014	5,014	5,014
12	5,302	5,302	5,302	5,302	5,302
18	5,036	5,036	5,036	5,036	5,036
24	5,696	5,696	5,696	5,696	5,696
30	5,977	5,977	5,977	5,977	5,977
36	6,877	5,654	4,909	4,717	4,605
45	7,099	5,829	5,019	4,808	4,716

**Tableau IX.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg1 formé sur le PVC après traitement le 18<sup>ème</sup>.

Jours/[Chlore]	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	150 mg/l	200 mg/l
3	3,957	3,957	3,957	3,957	3,957
6	4,331	4,331	4,331	4,331	4,331
12	4,370	4,370	4,370	4,370	4,370
18	4,582	4,582	4,582	4,582	4,582
24	5,292	3,965	3,745	3,511	-
30	5,771	4,044	4,613	4,792	3,867
36	5,871	4,605	4,793	4,870	4,001
45	5,939	4,846	4,925	4,801	4,602

**Tableau X.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg 2-15 formé sur le PVC après traitement le 18<sup>ème</sup> jour.

Jours/[Chlore]	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	150 mg/l	200 mg/l
3	4,279	4,279	4,279	4,279	4,279
6	4,865	4,865	4,865	4,865	4,865
12	4,956	4,956	4,956	4,956	4,956
18	5,319	5,319	5,319	5,319	5,319
24	5,271	4,807	4,343	4,550	-
30	5,874	4,925	4,615	4,801	3,994
36	5,729	5,011	4,792	4,895	4,303
45	6,086	5,716	4,991	4,936	4,480

**Tableau XI.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg1 formé sur le PVC après traitement le 30<sup>ème</sup>.

Jours/[Chlore]	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	150 mg/l	200 mg/l
3	3,957	3,957	3,957	3,957	3,957
6	4,331	4,331	4,331	4,331	4,331
12	4,370	4,370	4,370	4,370	4,370
18	4,582	4,582	4,582	4,582	4,582
24	5,292	5,292	5,292	5,292	5,292
30	5,771	5,771	5,771	5,771	5,771
36	5,871	4,306	4,793	4,710	-
45	6,425	4,846	4,925	4,801	4,477

**Tableau XII.** Effet du chlore sur le biofilm de *L. pneumophila* sg 2-15 formé sur le PVC après traitement le 30<sup>ème</sup> jour.

Jours/[Chlore]	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	150 mg/l	200 mg/l
3	4,279	4,279	4,279	4,279	4,279
6	4,865	4,865	4,865	4,865	4,865
12	4,956	4,956	4,956	4,956	4,956
18	5,319	5,319	5,319	5,319	5,319
24	5,066	5,066	5,066	5,066	5,066
30	5,874	5,874	5,874	5,874	5,874
36	5,729	4,853	4,480	4,362	-
45	5,964	5,645	4,858	4,480	4,613

## ANNEXE 6

**Résultats de l'effet de chlorure de sodium sur la survie de *L. pneumophila* à l'état planctonique et en biofilm**

**Tableau I.** La survie de *L. pneumophila* sg1 dans l'eau de robinet stérile en présence et en absence de chlorure de sodium à différentes concentrations à 20°C.

Heures/[NaCl]	0 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %	3 %	4 %
0	5	5	5	5	5	5	5	5
6	3,705	4,158	3,737	3,586	3,579	3,774	3,631	3,479
24	3,618	4,288	3,331	3,494	3,313	3,474	2,978	2,766
48	3,607	4,058	3,260	3,440	3,384	2,486	2,387	2,334
72	3,573	4,147	3,053	3,188	3,017	2,384	1,954	2,182
96	3,211	3,955	2,829	2,945	2,380	2,290	2,270	2,090

**Tableau II.** La survie de *L. pneumophila* sg1 dans l'eau de robinet stérile en présence et en absence de chlorure de sodium à différentes concentrations à 37°C.

Heures/[NaCl]	0 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %	3 %	4 %
0	5	5	5	5	5	5	5	5
6	3,703	4,288	3,733	3,677	3,586	2,812	2,625	2,305
24	3,615	4,210	3,057	3,269	2,627	1,991	1,991	1,114
48	3,574	4,160	2,914	2,914	2,548	1,881	1,531	1,204
72	3,333	3,992	2,799	2,732	1,949	1,778	1,301	0,903
96	3,211	3,779	2,736	2,114	1,914	1,724	0,778	0,602

**Tableau III.** La survie de *L. pneumophila* sg2-15 dans l'eau de robinet stérile en présence et en absence de chlorure de sodium à différentes concentrations à 20°C.

Heures/[NaCl]	0 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %	3 %	4 %
0	5	5	5	5	5	5	5	5
6	4,206	4,079	3,736	3,681	3,586	3,280	2,630	2,479
24	4,151	4,058	3,618	3,767	3,709	3,322	2,470	2,344
48	4,081	4,128	3,636	3,646	3,677	3,178	2,422	2,332
72	3,989	4,256	3,329	3,511	3,534	3,019	2,193	2,250
96	3,988	4,204	2,827	3,351	2,946	2,695	2,170	2,228

**Tableau IV.** La survie de *L. pneumophila* sg2-15 dans l'eau de robinet stérile en présence et en absence de chlorure de sodium à différentes concentrations à 37°C.

Heures/[NaCl]	0 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %	3 %	4 %
0	5	5	5	5	5	5	5	5
6	4,206	4,288	3,736	3,681	3,586	3,321	2,458	2,303
24	4,160	4,288	3,019	2,766	2,623	2,137	1,898	1,568
48	4,298	4,331	2,858	2,628	2,182	1,881	1,643	1,322
72	4,174	4,448	3,006	2,538	2,083	1,806	1,556	1,322
96	4,166	4,080	2,757	2,391	1,924	1,544	1,447	1,279

**Tableau V.** Effet de chlorure de sodium sur la croissance du biofilm de *L. pneumophila* sg2-15 après traitement le 6<sup>ème</sup> jour.

Jours/[NaCl]	0 %	1 %	2 %	4 %	8 %
2	4,344	4,344	4,344	4,344	4,344
4	4,959	4,959	4,959	4,959	4,959
6	5,219	5,219	5,219	5,219	5,219
10	5,313	4,931	4,974	4,629	4,011
15	5,896	4,931	4,974	4,022	3,095
18	5,933	4,600	4,022	3,796	2,465
20	6,980	4,860	4,162	3,648	1,973

**Tableau VI.** Effet de chlorure de sodium sur la croissance du biofilm de *L. pneumophila* sg2-15 après traitement le 15<sup>ème</sup> jour.

Jours/[NaCl]	0 %	1 %	2 %	4 %	8 %
2	4,344	4,344	4,344	4,344	4,344
4	4,959	4,959	4,959	4,959	4,959
6	5,219	5,219	5,219	5,219	5,219
10	5,313	5,313	5,313	5,313	5,313
15	5,896	5,896	5,896	5,896	5,896
18	5,933	5,403	4,916	4,351	3,207
20	6,980	5,482	5,451	3,975	3,179



**Tableau VII.** Effet de chlorure de sodium sur la croissance du biofilm de *L. pneumophila* sg1 après traitement le 6<sup>ème</sup> jour.

Jours/[NaCl]	0 %	1 %	2 %	4 %	8 %
2	4,079	4,079	4,079	4,079	4,079
4	4,788	4,788	4,788	4,788	4,788
6	4,866	4,866	4,866	4,866	4,866
10	4,946	4,658	4,389	4,011	3,778
15	5,820	4,550	4,162	3,351	2,283
18	6,279	4,600	3,978	3,095	1,964
20	6,344	4,720	4,162	2,389	1,954

**Tableau VIII.** Effet de chlorure de sodium sur la croissance du biofilm de *L. pneumophila* sg1 après traitement le 15<sup>ème</sup> jour.

Jours/[NaCl]	0 %	1 %	2 %	4 %	8 %
2	4,08	4,08	4,08	4,08	4,08
4	4,79	4,79	4,79	4,79	4,79
6	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87
10	4,95	4,95	4,95	4,95	4,95
15	5,82	5,82	5,82	5,82	5,82
18	6,28	5,00	4,62	4,06	2,66
20	6,34	5,11	4,70	3,18	2,41