THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Ecologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)
Secteur de recherche : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Présentée par :
Mathieu Dupuy

Association légionelles-amibes et traitements biocides pour les circuits de refroidissement

Directeur(s) de Thèse :
Yann Héchard, Florence Berne

Soutenue le 25 novembre 2013 devant le jury

Jury :

Président	**Jean-Marc Berjeaud**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	**Laurence Mathieu**	Maître de conférences, Université de Lorraine
Rapporteur	**Vincent Thomas**	Manageur projet R&D, Enterome, Paris
Membre	**Yann Héchard**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	**Florence Berne**	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	**Patrick Leprat**	Professeur des Universités, Université de Limoges

Pour citer cette thèse :
Mathieu Dupuy. *Association légionelles-amibes et traitements biocides pour les circuits de refroidissement* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

FACULTÉ DES SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Secteur de Recherche :

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Présentée par :

Mathieu DUPUY

Association légionelles-amibes et traitements biocides pour les circuits de refroidissement

Directeurs de Thèse

Yann HÉCHARD (Professeur, Université de Poitiers)
Florence BERNE (Maitre de conférences, Université de Poitiers)

Soutenue le 25 Novembre 2013, devant la commission d'Examem

Rapporteurs :	M. Vincent THOMAS	Manageur projet R&D, Enterome
	Mme Laurence MATHIEU	Maître de conférences, Université de Lorraine
Examinateurs :	M. Jean-Marc BERJEAUD	Professeur, Université de Poitiers
	M. Patrick LEPRAT	Professeur,Université de Limoges
	M. Yann HECHARD	Professeur, Université de Poitiers
	Mme Florence BERNE	Maître de conférences, Université de Poitiers

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier toutes les personnes qui ont permis la réalisation de cette thèse co-financée par EDF et l'ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) au travers d'une CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche) : **Jean Daniel Mattei**, chef du département LHNE, **Hubert Dupin** chef délégué du département, l'ancienne et l'actuelle chef de groupe P77 dans lequel s'est inscrit ma thèse **Anne-Lise Brasseur** et **Sophie Rapenne**. Je tiens également à remercier l'ancien directeur de laboratoire Chimie et Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 6008, **Jacques Frère** ainsi que le directeur de laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, **Didier Bouchon** de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et permis de réaliser une partie de mes travaux.

Je remercie également les membres du jury, **Laurence Mathieu** et **Vincent Thomas** qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que **Patrick Leprat** et **Jean Marc Berjaud** d'avoir accepter de faire parti de mon jury de thèse et d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier **Marie Binet**, **Céline Bouteleux** et **Pascaline Herbelin** pour m'avoir suivi durant ces 3 années de thèse et distillé leurs conseils. Je tiens à remercier **Florence Berne** pour sa disponibilité et l'aide fournie sur la partie chimie de la thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement **Yann Héchard** pour toutes ces années passées à m'encadrer, du master il y a 7 ans, à la thèse qui se termine en passant par les contrats effectués en partenariat avec EDF et Véolia. Merci, pour les discussions et les précieux conseils qui m'ont permis d'avancer tout au long de ces années. C'est avec une émotion particulière que je tiens à remercier **Sylvie Soreau**, qui m'a accompagné durant plus de 5 ans. Un grand merci pour ton aide, ta disponibilité et ton soutien, tu as toujours eu une vision positive et tu m'as transmis l'énergie pour continuer à avancer malgré les difficultés rencontrées.

Je remercie également toutes les nombreuses personnes que j'ai pu côtoyer durant cette thèse. Les personnes à Poitiers qui ont croisé ma route dans les locaux de l'IBMIG: l'équipe Biocydex, celle de Art molécule. Les très nombreuses personnes du laboratoire de Poitiers, **Nono**, **Julien**, **Jean-Marc**, **Stéphanie**, **Thomas**, **Christophe**, **Renaud**, **Julien**, **Didi**, **Clémence** mais aussi **Daniel** et **Karine.** Sans vous, ces années passées à Poitiers n'auraient pas été aussi enrichissantes et autant agréables.
Avec un petit pincement au cœur, je tiens à remercier **Marie Claude** pour les bons moments passés.
Pour toutes ces belles années, ces bons moments et ces nombreux échanges, je tiens à vous exprimer tout le plaisir que j'ai eu à être parmi vous.

Je tiens à remercier également les personnes qui ont partagé mon bureau à Poitiers et à Chatou en commençant par **Emilie** avec qui j'ai partagé le même bureau, à Poitiers, pendant 2 années. J'ai

apprécié les échanges scientifiques et personnels. Je voudrai ensuite remercier, **Vincent**, **Amélie** et **Delphine** pour leur accueil à mon arrivée à Chatou mais aussi **Julie** avec qui j'aurais passé un an et avec qui j'ai beaucoup échanger sur le doctorat, les interrogations, les motivations et bien d'autres choses encore. Un grand merci à vous tous pour les bons moments passés et les éclats de rire qui ont ponctué mon quotidien.

Je voudrais adresser mes remerciements à l'ensemble du groupe P77 ainsi qu'à **Sabine** pour leur accueil et leur aide précieuse mais aussi à **Lorraine,** et **Carole** pour les échanges dans les laboratoires. Je tiens à remercier plus particulièrement **Tiphanie** pour son travail réalisé, **Stéphanie** pour son aide technique, **Emilie** pour son aide logistique et **Samy** avec qui j'ai partagé bons nombres de péripéties et qui m'a permis de faire « mes meilleures manips de thèse » !!

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ____ ***11***

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ____ ***15***

Legionella ____ **16**

1. Généralités ____ 16
   - 1.1. Historique ____ 16
   - 1.2. Taxonomie ____ 16
   - 1.3. Génomique ____ 17
   - 1.4. Caractéristiques biochimiques ____ 18
2. Pathogénicité ____ 19
   - 2.1. Sources et voies de contamination ____ 19
   - 2.2. Pathologie ____ 20
   - 2.3. Epidémiologie ____ 21
   - 2.4. Traitements hospitaliers ____ 22
3. Ecologie ____ 23
   - 3.1. Habitats naturels ____ 23
   - 3.2. Habitats anthropiques ____ 24
   - 3.3. Association aux biofilms ____ 25
4. Cycle de vie biphasique ____ 28
5. Méthodes de détection et de quantification ____ 30
   - 5.1. Méthodes classiques de culture ____ 30
   - 5.2. Méthodes de biologie moléculaire ____ 31
   - 5.3. Bilan de la méthode classique et des méthodes de PCRq pour la détection et quantification de *Legionella* ____ 34

Amibes libres ____ **35**

6. Généralités ____ 35
   - 6.1. Historique ____ 35
   - 6.2. Classification ____ 36
   - 6.3. Pathogénicité ____ 37
     - *6.3.1. Acanthamoeba* ____ 38
     - *6.3.2. Naegleria fowleri* ____ 38
     - *6.3.3. Balamuthia spp.* ____ 39
     - *6.3.4. Sappinia diploidea* ____ 39
7. Biologie ____ 39
   - 7.1. Morphologie et cycle de vie ____ 39
   - 7.2. Locomotion ____ 42
   - 7.3. Nutrition ____ 42
8. Ecologie ____ 43
   - 8.1. Répartition dans l'environnement ____ 43
   - 8.2. Présence dans les biofilms ____ 44
9. Méthodes de détection ____ 45
   - 9.1. Méthodes de culture ____ 45
   - 9.2. Méthodes de PCR ____ 46

Relation amibes-légionelles ____ **48**

10. Implication des amibes dans la problématique *Legionella* ____ 48
    - 10.1. Les amibes, « chevaux de troie » ____ 48
    - 10.2. Relation amibes-*Legionella* ____ 49
11. Cycle de multiplication, aspects moléculaires et facteurs d'influence ____ 51
    - 11.1. Attachement et mécanismes de pénétration dans les amibes ____ 52
    - 11.2. Internalisation et dérivation de la voie d'endocytose ____ 53
    - 11.3. Prolifération et sortie des amibes ____ 54

11.4. Conséquences du passage des légionelles dans les amibes 57
11.5. Paramètres influençant la prolifération de *Legionella* 58
12. Différents types d'association légionelles/amibes 59
12.1. Présence de *Legionella* dans les kystes amibiens 59
12.2. Présence de *Legionella* dans les vésicules 61

Traitements chimiques 62
13. Réglementation *Legionella* 62
13.1. Réglementation des ICPE 62
13.2. Cas spécifiques des centrales électriques 63
14. Biocides chimiques 65
14.1. Biocides non oxydants 66
14.2. Biocides oxydants 66
14.2.1. Mode d'action des biocides oxydants 67
14.2.2. Efficacité de biocide et notion de Ct 67
14.2.3. Chlore 68
14.2.4. Monochloramine 74
14.2.5. Dioxyde de chlore 76
15. Paramètres impactants l'efficacité des biocides oxydants et *Legionella* 79
15.1. Facteurs microbiens 79
15.1.1. Effet physiologique 79
15.1.2. Protection du biofilm 81
15.2. Facteurs physico-chimiques 81
15.2.1. Effet de la température et du pH 82
15.2.2. Effet des ions et des éléments dissous 83
15.2.3. Effet des MES 84

MATERIEL ET METHODES 87
1. Souches de micro-organismes 88
2. Milieux et conditions de culture des micro-organismes 89
2.1. Culture de *Legionella* 89
2.2. Culture d'*Escherichia coli* 89
2.3. Culture d'amibes 89
2.3.1. Milieu non axénique 89
2.3.2. Milieu axénique 90
3. Numération des micro-organismes (méthodes classiques de microbiologie) 91
3.1. Dénombrement des légionelles 91
3.1.1. Par densité optique 91
3.1.2. Par dénombrement des UFC 91
3.2. Dénombrement des amibes 92
3.2.1. Dénombrement direct des amibes 92
3.2.2. Méthode du nombre le plus probable (NPP) 92
4. Co-culture 92
4.1. Co-culture en flasque 92
4.2. Co-culture en microplaque 93
5. Séquençage 94
6. Identification et quantification par biologie moléculaire 95
6.1. Quantitative Polymérase Chain Reaction (PCRq) 95
6.1.1. Extraction d'ADN 95
6.1.2. Principe 95
6.1.3. Réalisation de la gamme étalon 95
6.1.4. Conditions expérimentales 96
6.2. Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) 97
6.2.1. Principe 97
6.2.2. Fixation des cellules 97
6.2.3. Réalisation de l'hybridation et montage des lames 98
7. Méthodes de fixation 99
7.1. Fixation PFA et dérivés 99

7.2. Fixateur à base de zinc 99
7.3. Solution de Carnoy 99
7.4. Fixation HOPE 100
8. Méthodes de séparation 100
8.1. Solution de Percoll 100
8.2. Gradient de Percoll 100
8.3. Immuno-capture des légionelles 101
8.3.1. Objectifs et principe 101
8.3.2. Greffage des anticorps sur les billes magnétiques 101
8.3.3. Séparation des légionelles libres par immuno-capture 102
8.4. Filtration sur membrane 102
8.4.1. Sonication des échantillons avant filtration 102
8.4.2. Filtration sur membrane 103
9. Traitements chimiques 103
9.1. Tampon phosphate 103
9.2. Préparation et dosage de la monochloramine 103
9.3. Réalisation des désinfections 103
9.3.1. Préparation des échantillons à traiter 104
9.3.2. Réalisation des traitements 104
9.4. Calcul du Ct 105
RESULTATS ET DISCUSSION 107
Multiplication intra-amibienne de *Legionella pneumophila* 108
1. Isolement et identification des souches amibiennes 108
2. Choix et validation du protocole de co-culture en microplaque 110
2.1. Choix du protocole de co-culture 110
2.2. Témoin légionelles seules 111
2.3. Témoin amibes seules 113
2.4. Validation de la méthode de prélèvements 114
3. Co-cultures 115
3.1. Permissivité des souches d'amibes aux *L. pneumophila* 115
3.2. Effet de la température 123
3.3. Effet de la MOI 125
4. Bilan des co-cultures 129
Séparation des légionelles en fonction de leur état d'association 130
5. Choix de la méthode de séparation : essais préliminaires 130
5.1. Séparation par gradient de Percoll 131
5.1.1. Séparation trophozoites/kystes 131
5.1.2. Séparation amibes/légionelles 133
5.2. Séparation par immuno-capture 134
5.2.1. Séparation *Legionella/E.coli* 134
5.2.2. Test d'immuno-capture d'amibes 135
5.3. Séparation par filtration sur membrane 136
6. Mise en place du protocole de séparation des légionelles en fonction de leur état d'association 138
7. Séparation des légionelles libres/intra-amibiennes 140
7.1. Fixateurs Paraformaldéhyde et dérivés 140
7.1.1. Fixation à l'aide du paraformaldéhyde 140
7.1.2. Fixation à l'aide de tampon formaline 142
7.2. Fixateur à base de zinc 142
7.3. Solution de Carnoy 144
7.4. Fixation HOPE 144
7.5. Filtration en solution de Percoll 146
7.5.1. Evaluation de la méthode de séparation des *Legionella* libres et intra-amibiennes 147
7.5.2. Bilan de la séparation des *Legionella* libres et intra-amibiennes 153
8. Recherche de *Legionella* intra-kystes 154
8.1. Visualisation de bactéries intra-kystes 154

8.2. Production et recherche de *Legionella* intra-kystes dans des échantillons de laboratoire _____ 155
9. Séparation *Legionella* totales et *Legionella* intra-kystes _____ 157
9.1. Essais sur des eaux de pilote _____ 157
9.2. Ajout du prétraitement et augmentation de la concentration en SDS _____ 160
9.3. Evaluation du protocole de séparation *Legionella* totales et *Legionella* intra-kystes _____ 162
10. Bilan et perspectives de la méthode de séparation _____ 164

Traitements chimiques_____ 168
11. Objectifs des traitements_____ 169
12. Effet Physiologique, traitement en tampon phosphate _____ 169
12.1. Traitements en phase exponentielle et en phase stationnaire _____ 171
12.2. Traitements des co-cultures _____ 175
12.3. Comparaison de la sensibilité de *L. pneumophila* Lens en fonction de la phase physiologique associée ou non aux amibes. _____ 176
13. Effet matrice_____ 179
13.1. Comparaison des trois eaux de rivières _____ 179
13.1.1. Analyse physico-chimique _____ 179
13.1.2. Demande en monochloramine des eaux de rivières_____ 181
13.2. Comparaison de la sensibilité des légionelles dans les trois eaux de rivières brutes _____ 181
13.3. Effet des MES (eaux filtrées, brutes et enrichies)_____ 185

DISCUSSION GENERALE _____ 189
CONCLUSION ET PERSPECTIVES _____ 199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____ 203
ANNEXES_____ 223

Annexe 1: Séquences des amorces utilisées en Séquençage, PCRq et FISH_____ 224

Annexe 2: Solutions utilisées pour la méthode FISH _____ 225

Annexe 3: Solutions utilisées pour l'immuno-capture _____ 227

Annexe 4: tableau NNP 3 : dénombrement par méthode NPP _____ 228

Annexe 5: Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba* _____ 229

Annexe 6: Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants __ 239

Liste des tableaux

Tableau 1 : 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) _____ *34*
Tableau 2 : Espèces de protozoaires décrites comme permettant la multiplication intracellulaire de Legionella spp. (Lau and Ashbolt, 2009) _____ *50*
Tableau 3 : Fréquence des prélèvements de mesure en fonction des concentrations en Legionella spp. _____ *64*
Tableau 4 : Valeurs d'inactivation ($Ct_{99\%}$) de kystes par le chlore, d'après Loret and Greub, 2010 _____ *73*
Tableau 5 : Valeurs d'inactivation ($Ct_{99\%}$) des kystes par le dioxyde de chlore, d'après Loret and Greub, 2010 _ *78*
Tableau 6: Souches bactériennes utilisées au cours de l'étude _____ *88*
Tableau 7: Souches amibiennes utilisées au cours de l'étude _____ *88*
Tableau 8 : Identification par séquençage de l'ARN 18S des souches amibiennes _____ *109*
Tableau 9 : Comparaison statistique de la multiplication de L.pneumophila Lens en fonction du genre amibien _____ *119*
Tableau 10 : Comparaison statistique de la multiplication de L.p. Lens en fonction de la température _____ *124*
Tableau 11 : Dénombrement de Legionella et E. coli avant et après séparation par immuno-capture _____ *135*
Tableau 12 : Dénombrement des amibes (Acanthamoeba, Hartmannella et Naegleria), par méthode NPP 3, avant et après séparation par immuno-capture _____ *136*
Tableau 13 : Dénombrement des micro-organismes par méthode NPP 3 avant et après filtration (n=3) _____ *137*
Tableau 14 : Dénombrement des micro-organismes, après fixation HOPE, avant et après filtration sur membrane (n=3) _____ *145*
Tableau 15 : Dénombrement des Legionella libres et des trophozoites d'Acanthamoeba avant et après filtration dans des solutions de Percoll de différentes concentrations (0, 20, 60, 80 et 100%) _____ *147*
Tableau 16 : Dénombrement des Legionella libres, mises en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration _____ *148*
Tableau 17 : Dénombrement des Acanthamoeba, mises en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration _____ *149*
Tableau 18 : Dénombrement des Naegleria, mises en suspension dans une solution de Percoll à 20%, _____ *150*
Tableau 19 : Dénombrement des micro-organismes, lors des essais avec des Legionella intra-trophozoites, mis en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration _____ *151*
Tableau 20 : Dénombrement des micro-organismes, lors des essais avec des Legionella mélangées à des trophozoites, mis en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration _____ *152*
Tableau 21 : Dénombrements des Legionella avant et après application du traitement sur les premiers essais échantillons environnementaux _____ *159*
Tableau 22 : Dénombrement de Legionella avant et après traitement, de l'échantillon environnemental, par le protocole complémenté par le pré-traitement et l'augmentation de la concentration en SDS (n=3) _____ *160*
Tableau 23 : Variation des concentrations en Legionella, issues de culture en BYE, après 30 ou 60 minutes dans les erlens témoins sans traitement _____ *172*
Tableau 24 : Estimation des valeurs $Ct_{99,9\%}$ des deux souches de Legionella testées, en fonction de la phase physiologique _____ *173*
Tableau 25 : Variation des concentrations en Legionella, issues de co-culture, après 30 ou 60 minutes dans les erlens témoins sans traitement _____ *175*
Tableau 26 : Estimation des valeurs de $Ct_{90\%}$ et $Ct_{99,9\%}$ de Legionella Lens en fonction de la phase physiologique, associée ou non aux amibes _____ *177*
Tableau 27 : Caractéristiques physico-chimiques des eaux de rivières Loire, Vienne et Moselle _____ *180*
Tableau 28 : Surconsommation de monochloramine exprimée en pourcentage, après 60 minutes, dans les eaux de rivières (filtrées, brutes, enrichies) par rapport à la consommation en tampon phosphate _____ *181*
Tableau 29 : Variation des concentrations en Legionella, dans les erlens témoins sans traitement, des eaux de rivières et pour les trois conditions (filtrées, brutes, enrichies) _____ *182*
Tableau 30 : Comparaison des $Ct_{99,9\%}$ (mg.min/L) dans les différentes eaux de rivières brutes, filtrées ou enrichies en MES et en tampon phosphate _____ *186*

Liste des figures

Figure 1 : Evolution du nombre de cas et du taux d'incidence de la légionellose en France, 1988-2011 (d'après InVS) 22
Figure 2 : Les 5 étapes de la formation d'un biofilm d'après Courtesy Peg Dirck et David Davies 26
Figure 3 : Développement et relargage de Legionella spp. dans un réseau d'eau potable (Lau and Ashbolt, 2009) 27
Figure 4 : Cycle de vie de L. pneumophila (Molofsky and Swanson, 2004). 29
Figure 5 : Principe de l'hybridation en méthode FISH (A) et en méthode Card-FISH (B) (Amann 08) 33
Figure 6 : Classification des genres Hartmannella, Acanthamoeba et Naegleria adaptée (Adl et al., 2005) 37
Figure 7 : Trophozoite (a) et kyste (b) d'Acanthamoeba castellanii, grossissement X 1000 (Visvesvara et al., 2007) 41
Figure 8 : Trophozoites (a), forme flagellée (b), et kyste (c) de Naegleria fowleri, grossissement X1000 (Visvesvara et al., 2007). 41
Figure 9 : Trophozoites (1 et 2) et kystes (3 et 4) d'Hartmanella vermiformis (Smirnov, 1999) 42
Figure 10 : Cycle de vie de Legionella dans les trophozoites d'après Richards et al., 2013 56
Figure 11 : L. pneumophila appartenant au sérogroupe 1 agrégées dans un kyste d'A. palestinensis (Skinner et al., 1983) 60
Figure 12 : Schéma d'une TAR type ouvert (http://www.installationsclassees.developpement-durable.gouv.fr/5-Tours-aerorefrigerantes.html) 62
Figure 13 : Schéma d'une TAR type fermé (http://www.installationsclassees.developpement-durable.gouv.fr/5-Tours-aerorefrigerantes.html) 63
Figure 14 : Mode de fonctionnement et différents circuits d'une centrale électrique (http://encyclopedieelectricite.edf.com/production/industriels/nucleaire/fonctionnement.html) 64
Figure 15 : Cibles cellulaires potentielles pour les biocides oxydants, d'après Malato et al., 2009 67
Figure 16 : Equilibre des différentes espèces du chlore dans l'eau en fonction du pH (Cimetiere, 2009) 69
Figure 17 : Distribution des espèces de chlore en fonction du rapport molaire N/Cl 74
Figure 18 : Colonies de L. pneumophila après culture et ensemencement par l'ensemenceur spiral 91
Figure 19 : Schéma d'une microplaque de co-culture 93
Figure 20 : Schéma des gradients de Percoll utilisés pour la séparation des micro-organismes 101
Figure 21 : Suivi de la cultivabilité, sur 72 heures, de L. pneumophila Lens (MOI 0,1 et MOI 10) dans le milieu de co-culture 111
Figure 22 : Suivi de la cultivabilité, sur 72 heures, de L. pneumophila QEE6945 dans le milieu de co-culture 112
Figure 23 : Suivi de la cultivabilité, sur 72 heures, de L. pneumophila QEE4795 dans le milieu de co-culture 112
Figure 24 : Observation microscopique de la souche Ng 242 seule, dans le milieu de co-culure, à t0, t24, t48 et t72 heures (grossissement x160) 113
Figure 25 : Suivi de la concentration en Legionnella à l'aide des deux méthodes de prélèvements 114
Figure 26 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de L.p. Lens en co-culture avec Acanthamoeba à la MOI 0,1 116
Figure 27 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de L.p. Lens en co-culture avec Naegleria à la MOI 0,1 117
Figure 28 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de L.p. Lens en co-culture avec Hartmannella à la MOI 0,1 118
Figure 29 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de L.p. Lens et L.p. QEE 6945 en co-culture avec les amibes (MOI 0,1) 121
Figure 30 : Aspect de la souche Ht 113 dans le puits de co-culture, à 25°C et 40°C, après 72 heures (grossissement x160) 123
Figure 31 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de L.p. Lens en co-culture avec Acanthamoeba à la MOI 10 126
Figure 32 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de L.p. Lens en co-culture avec Naegleria à la MOI 10 127
Figure 33 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de L.p. Lens en co-culture avec Hartmannella à la MOI 10 128
Figure 34 : Comparaison de la séparation de trophozoites seuls et de kystes seuls d'Acanthamoeba sur gradient de Percoll 131
Figure 35: Gradient de Percoll simplifié pour la séparation trophozoites/kystes 132
Figure 36 : Observation des 3 phases différentes obtenues après séparation de légionelles et d'amibes (trophozoites) par un gradient de Percoll 133

Figure 37 : Schéma global des traitements envisagés pour la séparation des légionelles selon leur état d'association *139*
Figure 38 : Migration des produits de PCR amibe après fixation préalable au PFA *141*
Figure 39 : Aspect des trophozoites après « fixation » dans un tampon à base de zinc (x400) *143*
Figure 40 : Aspect des trophozoites avant et après fixation avec la solution de Carnoy (X400) *144*
Figure 41: Schéma du protocole pour la séparation des légionelles libres et des légionelles intra-amibiennes. *146*
Figure 42 : Observation des kystes d'Acanthamoeba après hybridation (A) avec la sonde EUB, (B) avec la sonde LEG 705 (X400) *155*
Figure 43 : Observation de kystes d'Acanthamoeba (A, C et D) et de Naegleria (B) potentiellement infectés par Legionella, après marquage à l'aide des sondes Legall 11, Legall 22, LEG 705 et LEG 226 ..... *156*
Figure 44 : Schéma global du protocole utilisé lors des premiers essais de séparation de Legionella totales et intra-kystes..... *158*
Figure 45 : Détection de légionelles par microscopie, après marquage par méthode FISH, dans des échantillons environnementaux traités par le protocole de séparation..... *161*
Figure 46 : Schéma du protocole final mis en place pour la séparation des légionelles totales et intra-kystes.. *162*
Figure 47 : Efficacité du traitement par le protocole de séparation de Legionella libres et intra-kystes sur Legionella *163*
Figure 48 : Efficacité du traitement par le protocole de séparation de Legionella libres et intra-kystes sur les kystes amibiens *164*
Figure 49 : Organigramme des 5 méthodes pour la détection de Legionella extra et intracellulaires d'après (Kao et al., 2012) *166*
Figure 50 : Croissance de L. pneumophila Lens. Le suivi de croissance est réalisé par mesure de la DO à 595 nm pendant 142 heures. L'inoculum de départ est fixé à 10^7 UFC/ml. *170*
Figure 51 : Suivi du résiduel de monochloramine dans les témoins tampon phosphate seul *171*
Figure 52 : Organigramme du principe du protocole suivi lors des traitements de Legionella à la monochloramine *171*
Figure 53 : Réduction de la cultivabilité de L. pneumophila Lens et QEE 6945, en fonction de la phase de croissance, après traitement à la monochloramine..... *172*
Figure 54 : Réduction de cultivabilité de L. pneumophila Lens et QEE 6945 issues de différents temps de co-cultures, après traitement à la monochloramine..... *175*
Figure 55 : Réduction de cultivabilité de L. pneumophila Lens en phase exponentielle dans différentes eaux brutes de rivière et en tampon phosphate pH 8..... *182*
Figure 56 : Réduction de cultivabilité de L. pneumophila Lens en phase stationnaire dans différentes eaux brutes de rivière et en tampon phosphate pH 8..... *183*

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide ribonucléique

BCYE : « Buffer Charcoal Yeast Extract »

BYE : « Buffer Yeast Extract »

CARD-FISH : « Catalyzed reporter deposition - FISH »

COD : Carbone organique dissous

CRF : Circuit de refroidissement

Ct : Concentration x temps de contact

DO : Densité optique

DPD : Diéthyl-p-phénylènediamine

EDF : Electricité de France

FISH : « Fluorescent in situ Hybridization »

GVPC : Glycine, Vancomycine, polymyxine B, Cycloheximide

HOPE : « Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect »

LCV : « *Legionella* containing vacuole »

LB : Luria-bertani

LPS : Lipo-polyssacharide

MEAP : Méningo encéphalite amibienne primitive

MES : Matière en suspension

MIF : « Mature intracellular form »

MOI : « Multiplicity of infection »

MVS : Matière volatile sèche

NNA : « Non-nutrient agar »

NPP : Nombre le plus probable

PBS : « Phosphate buffer solution »

PCR : « Polymérase chain reaction »

PCRq : « Quantitative polymérase chain reaction quantitative»

PFA : Paraformaldéhyde

RER : Reticulum endoplasmique rugeux

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SUVA : « Specific UV absorbance »

TAR : Tour aéro-réfrigérante

UG : Unité génome

UFC : Unité formant colonie

VBNC : « viable but not cultivable»

INTRODUCTION GENERALE

L'anthropisation des milieux due aux activités humaines n'est pas sans conséquence. De nos jours, notre société est à la recherche d'un équilibre entre développement et préservation des ressources naturelles. L'eau est l'une de ces ressources que l'Homme essaie de préserver. En France, les engagements du grenelle de l'environnement impose d'atteindre d'ici 2015 un *« bon état écologique de l'eau c'est à dire, une eau qui permet une vie animale et végétale riche et variée, une eau exempte de produits toxiques, une eau disponible en quantité suffisante pour satisfaire tous les usages »*. EDF via sa politique environnementale s'est également engagée à préserver les ressources et l'environnement par la maîtrise des impacts de ses activités industrielles.

De par le mode fonctionnement des centrales électriques, des eaux de surfaces sont prélevées afin de condenser la vapeur du circuit secondaire et de contrôler l'excès de chaleur produit. Les besoins en eau de refroidissement des centrales sont très importants (2 m^3/seconde pour un circuit fermé avec aéro-réfrigérant) bien qu'une grande partie de l'eau prélevée soit restituée au milieu naturel. L'utilisation de ces eaux de surface provoque une modification des paramètres physico-chimiques et biologiques de ces eaux parallèlement à leur réchauffement. Les conditions de fonctionnement de certains circuits de refroidissement, impliquant un temps de séjour de plusieurs heures des eaux brutes en contact avec de grandes surfaces, associé à ce réchauffement, peuvent entraîner la prolifération de micro-organismes thermophiles naturellement présents dans l'environnement dont *Legionella pneumophila* fait partie. Cette bactérie peut être responsable, en cas d'inhalation de gouttelettes contaminées d'une infection pulmonaire aiguë, la légionellose, qui dans certains cas peut entraîner le décès. Au plan réglementaire, le risque de légionellose est un problème de santé publique identifié comme étroitement lié aux systèmes susceptibles de générer des aérosols contaminés (Campese *et al.*, 2010) comme les établissements thermaux, les eaux chaudes sanitaires et les tours de refroidissement (Che *et al.*, 2011; Jansa *et al.*, 2002; Mouchtouri *et al.*, 2010).

Afin de lutter contre le développement de ce pathogène, EDF met en œuvre un traitement biocide dans ses circuits : la monochloramine. Ce traitement permet de réduire significativement le développement des légionelles et, en deçà des seuils réglementaires. Toutefois, pour EDF, l'enjeu est de trouver le meilleur compromis entre la gestion du risque sanitaire lié au développement des légionelles et la gestion du risque environnemental lié aux rejets chimiques du traitement à la monochloramine. Dans cet objectif, il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur les facteurs susceptibles d'influer sur la sensibilité de *Legionella* au traitement biocide.

Malgré l'application de traitement de l'eau, des proliférations de *Legionella pneumophila* dans les installations industrielles ou dans les réseaux de distribution d'eau peuvent avoir lieu. Ces proliférations peuvent être dues à un défaut du traitement ou à une protection plus efficace des bactéries, apportée par le biofilm, une présence dans les amibes et/ou un état physiologique particulier

(Taylor *et al.*, 2009). Dans les circuits, les légionelles sont retrouvées dans l'eau circulante ou fixées dans un biofilm (Borella *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2009). Il a été clairement établi que leur multiplication a lieu dans des protozoaires, comme les amibes libres (Molmeret *et al.*, 2005; Rowbotham, 1986). La multiplication sous forme libre (extracellulaire) est plutôt considérée comme marginale (Kuiper *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2013). L'étude de la relation légionelles-amibes est donc primordiale. Plusieurs amibes ont montré leur permissivité pour la multiplication des légionelles mais, dans l'environnement, il est difficile de dire quelles amibes sont les réservoirs principaux des légionelles. De plus, les amibes peuvent se retrouver sous deux formes cellulaires : la forme végétative, le trophozoite, capable de se nourrir, de se déplacer et de se multiplier ; et la forme de dormance, le kyste, formée en cas de stress notamment nutritionnel (Byers *et al.*, 1991). Les légionelles sont capables de se multiplier dans les trophozoites et elles ont parfois été retrouvées dans des kystes (Kilvington and Price, 1990; Skinner *et al.*, 1983). Comme les kystes sont plus résistants que les trophozoites aux traitements, les légionelles intra-kystes seraient donc particulièrement protégées et pourraient constituer un réservoir de légionelles. L'association ou non des légionelles avec les amibes (libres, intra-trophozoites ou intra-kystes) influe certainement sur leur sensibilité aux traitements (Thomas *et al.*, 2009). Or actuellement, dans l'environnement cet état d'association avec les amibes n'est pas connu. Par ailleurs, l'état physiologique dans lequel se trouve la bactérie a également un rôle; Ayyildiz *et al.* indiquent que les bactéries en phase stationnaire prolongée seraient plus difficiles à éliminer que les bactéries en phase exponentielle de croissance (Ayyildiz *et al.*, 2009). Enfin, parmi les facteurs susceptibles d'influer sur la sensibilité des légionelles au traitement, certains éléments peuvent interférer dans l'accessibilité des micro-organismes au traitement comme par exemple les matières en suspension présentes dans le milieu (Dickenson and Sansalone, 2011; Narkis *et al.*, 1995) ou le biofilm (Maillard, 2007) qui limite la diffusion du biocides. Selon (Sanli-Yurudu *et al.*, 2007), la moindre sensibilité aux biocides des *Legionella* sessiles comparées aux bactéries planctoniques, serait due à la double protection physique et physiologique et requiert l'utilisation de doses de biocide plus importantes. (Alleron *et al.*, 2008) indiquent, par ailleurs, que *L. pneumophila* pourrait persister longtemps dans les biofilms dans un état physiologique particulier, viable mais non cultivable, après un traitement à la monochloramine. Toutefois, la littérature demeure encore très pauvre sur ces sujets dans des environnements complexes.

L'objectif principal de cette thèse était donc d'améliorer les connaissances sur les associations des légionelles avec les amibes dans les circuits de refroidissement et d'apporter des éléments pour mieux évaluer leur sensibilité au traitement à la monochloramine dans ces environnements complexes. Il s'agissait en particulier de développer des méthodes et de progresser dans les connaissances pour pouvoir répondre à terme à deux questions principales :

- Quel est l'état d'association des légionelles dans les circuits (libres, intra-trophozoites ou intra-kystes, dans quelles amibes) ?

- Quel est l'impact du milieu environnant sur l'efficacité des traitements en fonction de l'état d'association des légionelles ?

Après avoir dressé un bilan des connaissances scientifiques sur ces sujets, trois axes de recherche ont été développés :

- Le premier axe visait à évaluer la capacité des genres amibiens (*Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria*) issus des circuits tertiaires de centrales électriques à héberger et à permettre la prolifération de différentes souches de *Legionella pneumophila*. Diverses conditions de température et de ratio légionelles/amibes ont été testées. Les résultats obtenus complètent les données de la littérature. Cet axe devrait permettre, en particulier, d'identifier quelles amibes sont les plus susceptibles d'héberger et de constituer un réservoir de légionelles.

- Le second axe consistait à rechercher une méthode de détection de l'état d'association des légionelles avec les amibes. Pour ce faire, le développement d'une méthode de séparation physique des légionelles libres ou associées aux amibes sous forme trophozoite ou kyste permettant leur quantification a été entrepris.

- Le troisième axe avait pour objectif de réaliser une évaluation comparée de la sensibilité au traitement à la monochloramine des légionelles dans différentes états. Initialement, la méthode de séparation mise en place dans l'axe deux devait être utilisée pour comparer la sensibilité des légionelles libres et intra-amibiennes (trophozoites et kystes) en eau brute. Les difficultés techniques ont orienté les recherches vers une comparaison de la sensibilité de *Legionella* en fonction de son état physiologique (phase exponentielle, stationnaire, après passage dans les amibes). L'impact de la qualité de l'eau et des MES sur la sensibilité de *Legionella* aux traitements monochloramine a également été étudié.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

LEGIONELLA

1. Généralités

1.1.Historique

Le genre *Legionella* a été établi en 1978 à la suite d'une épidémie de pneumonie qui eut lieu en 1976 lors de la 58ème convention annuelle de la Légion Américaine à Philadelphie, en Pennsylvanie (McDade *et al.*, 1977). L'épidémie toucha 182 personnes nécessitant l'hospitalisation de 147 d'entre elles et entraina le décès de 29 individus (Fraser *et al.*, 1977). Ce n'est que l'année suivante que l'agent responsable de cette épidémie a été isolé 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).

Néanmoins, le premier isolement de souche de *Legionella* revient au capitaine Huhg Tatlock, un physicien militaire. Il a été assigné par l'armée pour investiguer sur une épidémie d'une maladie éruptive au Fort Bragg en Caroline du Nord en Août 1942. Il n'a pas été capable d'identifier l'agent responsable qui a été classé comme appartenant au genre *Rickettsia* (Fields *et al.*, 2002) dans un premier temps, puis, comme un comme un nouveau virus aux propriétés immunologiques non reliées aux *Rickettsia* (Tatlock, 1947).

1.2.Taxonomie

La famille des *Legionellaceae* est constituée par le seul genre *Legionella* (Fields *et al.*, 2002). Cette famille forme un seul sous-groupe de la sous-division ɣ des protéobactéries. L'analyse des séquences d'ARN 16S des *Legionellaceae* indiquent que les membres de cette famille sont phylogénétiquement très proches (> 95% d'homologie de séquence) (Fry *et al.*, 1991). L'espèce la plus proche d'un point de vue phylogénétique est *Coxellia burnetii*, agent de la fièvre Q (Weisburg *et al.*, 1989). *Legionella* partage 42% de ses gènes avec *C. burnetti* (Chien *et al.*, 2004). *C. burnetii* est un pathogène intracellulaire obligatoire qui est capable se répliquer dans les macrophages alvéolaires et qui présente deux phases, une phase réplicative et une stationnaire, comme *Legionella* (Swanson and Hammer, 2000).

Le nombre d'espèces et de sérogroupes appartenant au genre *Legionella* continue d'augmenter. Le nombre d'espèces connues en 2008 était de plus de 50 incluant plus de 70 sérogroupes différents. A elle seule, l'espèce *L. pneumophila* compte au moins 16 sérogroupes (Diederen, 2008). Les autres espèces comptent moins de sérogroupes, deux chacun pour *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleii, L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra*, and *L. quinlivanii*, et un seul sérogroupe pour les autres espèces (Benson and Fields, 1998).

Enfin, la famille des *Legionellaceae* comprend d'autres bactéries qui ne peuvent pas être cultivées *in vitro*. Elles sont appellées LLAPs (*Legionella*-Like Amoebal Pathogens) pour leur habilité à infecter et à se multiplier intra-cellulairement dans les amibes (Adeleke *et al.*, 1996) Elles ont été regroupées en 5 embranchements génétiques différents.

1.3.Génomique

6 génomes de différentes souches de *L. pneumophila* ont été publiés (Paris, Lens, Philadelphie, Corby, Alcoy et 130b). Les souches Lens et Paris ont été isolées lors d'épidémies en France (Cazalet *et al.*, 2004). Les génomes sont constitués d'un chromosome circulaire de 3,5 Mpb (Méga Paire de Bases) et 3,35 Mpb, respectivement, avec un pourcentage de G-C de 38% et un nombre de gènes prédit d'environ 3000. La souche Philadelphie 1 qui dérive de l'isolat initial de 1976 a un génome de 3,4 Mpb avec un pourcentage de G-C de 38% également, les insertions de séquences constituent 2,4% du génome et sont dispersées dans le génome (Chien *et al.*, 2004). Ces 3 souches (Lens, Paris et Philadelphie) possèdent 9 à 13% de gènes spécifiques, pourcentage important pour 3 souches de la même espèce (Cazalet and Buchrieser, 2005). Le génome de la souche Corby, souche particulièrement virulente isolée d'un patient, présente les mêmes caractéristiques que les souches précédemment citées (3,6 Mbp et un pourcentage de G-C de 38%) avec un génome codant environ 3000 protéines (Steinert *et al.*, 2007). Le séquençage de la souche environnementale 130b, génome de 3,47 Mpb, indique que les caractéristiques des autres souches précédemment séquencées sont également retrouvées chez cette souche (Schroeder *et al.*, 2010).

Le génome de *L. pneumophila* reflète la co-évolution de cette bactérie avec des cellules eucaryotes comme les protozoaires ou les macrophages pulmonaires lors de l'infection de l'Homme. Par exemple, la présence des gènes codant pour le système dot/icm (*Defect in Organelle Trafficking/ IntraCellular Multiplication*), impliqué dans le mode de vie intra-cellulaire, a été trouvée chez *Legionella* et chez *C. burnetti*, espèce la plus proche phylogénétiquement. Une soixantaine de gènes codant pour des protéines ayant des similitudes avec des protéines eucaryotes est retrouvée chez *L. pneumophila*. Beaucoup de ces protéines possèdent des motifs d'interactions protéiques retrouvés essentiellement chez les eucaryotes. La présence de ces protéines suggère que *L. pneumophila* est capable d'interagir

avec son hôte et de moduler les fonctions de la cellule hôte pour les détourner à son avantage (Cazalet and Buchrieser, 2005). Cette intéraction avec la cellule hôte se reflète également dans le génome de *L. longbeachae* (4,05 Mpb, pourcentage de G-C de 37%). Ce génome code pour un système de sécrétion de type IV Icm/Dot tout comme *L. pneumophila* mais, par contre, ne contient pas de gènes de biosynthèse du flagelle traduisant l'adaptation de cette espèce à un mode de vie dans le sol et non pas dans un environnement aqueux (Kozak *et al.*, 2010). De plus, d'après Ewann et Hoffman, l'absence de deux enzymes clefs dans la biosynthèse de la cystéine (la sérine acétyltransférase et la cystéine synthase) dans le génome de *L. pneumophila* serait une preuve biochimique que ce bacille est contraint à un mode de vie intracellulaire dans les environnements naturels où la cystéine n'est pas disponible (Ewann and Hoffman, 2006).

Récemment une souche pathogène de *L. pneumophila* appartenant non pas au sérogroupe 1, comme ce fut le cas pour les souches citées précédemment, mais au sérogroupe 12 a été séquencée. Ce génome possède de grandes similitudes avec les six autres génomes séquencés, à savoir un unique chromosome circulaire de 3,36 Mpb pour un pourcentage de G-C de 38,2%. Néanmoins quelques différences sont à noter comme par exemple la présence d'un cluster de gènes de 46 kb codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse des lipopolysaccharides (Amaro *et al.*, 2012).

1.4.Caractéristiques biochimiques

L. pneumophila est un bacille à Gram négatif (prenant faiblement la coloration par le rouge neutre ou la safranine), aérobie strict, catalase positive, non sporulé et non capsulé. Les cellules mesurent 0,3 à 0,9 µm de large sur 2 à 20 µm de long. *L. pneumophila* possède également 1 à 2 flagelles en position polaire ou subpolaire (Fields *et al.*, 2002; Ott *et al.*, 1991). La plupart des espèces produisent des β-lactamases et sont capables d'hydrolyser la gélatine. 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.*, 2002). 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 membrane de *L. pneumophila* est différente de celle des autres bactéries à Gram négatif. Elle présente deux spécificités. Premièrement, la présence de phosphatidylcholine dans la membrane en grande quantité (~ 30%). Ce phospholipide est principalement retrouvé chez les eucaryotes et est absent chez les procaryotes avec quelques exceptions pour des α et ɣ protéobactéries (Verdon *et al.*, 2011). Deuxièmement, la membrane de *Legionella* est caractérisée par la forte présence d'acides gras branchés (> 80%) (Moss *et al.*, 1977). Les ubiquinones de la paroi présentent la caractérisque de

posséder des chaînes latérales de 9 à 14 unités isopréniques (Benson and Fields, 1998). *L. pneumophila* et *L. micdadei* contiennent quelques ubiquinones à 13 unités isopréniques, là où les autres espèces de *Legionella* n'ont que des ubiquinones à 11 ou 12 unités isopréniques en majorité (Karr *et al.*, 1982). L'ensemble de ces spécificités différencie la membrane des légionelles de celles des autres bactéries à Gram négatif (Lambert and Moss, 1989). Ces particularités de la composition membranaire en acides gras, similaires à celles de bactéries thermophiles, peuvent être mises en relation avec les environnements où *L. pneumophila* est retrouvée (Fliermans *et al.*, 1981).

2. Pathogénicité

Legionella étant une bactérie pathogène, dans cette partie les sources et voies de transmission vont être abordées dans un premier temps puis un point plus médical sera réalisé avec une description de la maladie. Des données épidémiologiques ainsi que le descriptif des traitements utilisés pour la pathologie associée à ce bacille seront également présentés.

2.1. Sources et voies de contamination

Legionella pneumophila est une bactérie présente dans les environnements aquatiques naturels et artificiels (rivières, lacs, eaux thermales, sols humides) (Diederen, 2008; Philippe *et al.*, 2006). Cette bactérie est capable de survivre dans une large gamme de conditions extrêmes, comme par exemple une gamme de température allant de 6 à 63°C (Fliermans *et al.*, 1981). Plus généralement, la bactérie est retrouvée dans les environnements hydrotelluriques (Buse *et al.*, 2011; Fields *et al.*, 2002). Le mode de transmission à l'Homme se fait par inhalation d'aérosols contaminés (Yu, 1993). Les aérosols de 1 à 10 µm peuvent pénétrer dans la région alvéolaire des poumons. Cette voie de transmission était déjà le mécanisme présumé d'infection depuis les années 80 (Muder *et al.*, 1986). La transmission d'Homme à Homme n'est pas avérée (Fields, 1996). Les sources principales de contamination sont donc les installations et les environnements dans lesquels l'Homme est exposé à des aérosols ce qui inclus les TAR (Tour Aéro-Réfrigérante), les piscines, les spas, les unités dentaires, les douches, les machines à glace, les brumisateurs pour les légumes…(Atlas, 1999 ; Barrabeig *et al.*, 2010). D'après une étude récente la densité critique de *Legionella* dans l'air, c'est-à-dire la concentration à partir de laquelle un risque pour la santé Humaine apparaitrait, a été estimée aux alentours de $3{,}5.10^{1}$ à $3{,}5\ .10^{2}$ UFC (Unité Formant Colonie)/m^3 (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 (Mekkour *et al.*, 2013 ; Hambleton *et al.*, 1983).

Parmi les installations qui génèrent des aérosols, les TAR sont suspectées depuis une vingtaine d'années d'être associées à des épidémies du fait de la forte prévalence de *Legionella* dans ces installations (Shelton, 1994). La colonisation des TAR et des condenseurs à évaporation par *Legionella* avec la production d'aérosols qui en découlent, a été identifiée comme une des principales sources d'épidémie de légionellose (Buse *et al.*, 2011). Les épidémies entraînées par *Legionella* ont émergé durant la seconde partie du 20^{éme} siècle à cause de l'altération de l'environnement par l'Homme. La plupart des épidémies ont été reliées à des environnements aquatiques anthropiques, où les températures de l'eau sont plus élevées (Fields *et al.*, 2002) . En France, entre 1998 et 2008 la plupart des cas de légionellose a été associée à des systèmes de refroidissement (Campese *et al.*, 2010). Les installations industrielles (TAR, laveur d'air) pourraient permettre la dissémination du pathogène sur de grandes distances, peut-être supérieures à 10 km, si les paramètres météorologiques (vent, humidité de l'air) sont favorables (Nygard *et al.*, 2008). Ces installations présentent un double risque : celui d'être un environnement propice au développement du pathogène et celui de le disséminer par aérosolisation du fait de leur mode de fonctionnement. Ceci n'empêche pas les autres équipements (douches, spas, brumisateurs à légumes…) d'être également des sources et des environnements à risque vis-à-vis de *Legionella*. La souche *L. pneumophila* Paris a été retrouvée dans 24 hôpitaux de la région parisienne entre 1987 et 1997 à la suite de différents épisodes de légionellose témoignant de sa forte prévalence dans les réseaux de distribution d'eau de Paris (Lawrence *et al.*, 1999).

2.2.Pathologie

Les études épidémiologiques indiquent que *Legionella* est un pathogène opportuniste (Steinert *et al.*, 2002). Sa capacité 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 2 principales espèces de *Legionella* pathogènes pour l'Homme sont *L. pneumophila* et *L. longbeachae* (Whiley and Bentham, 2011). La maladie du légionnaire ou plus communément légionellose est la pathologie engendrée par *Legionella*. Il s'agit de la forme sévère pouvant se déclencher suite à une exposition à la bactérie. Une pneumonie se déclare dans un délai de 2 à 10 jours après l'exposition et dure une semaine en moyenne. 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 sérogroupe 1 de 84,2% alors que les sérogroupes 2 à 13 représentent seulement 7,4%, les autres espèces de légionelles complètent l'ensemble (Yu *et al.*, 2002). A noter tout de même que *L. longbeachae* est à l'origine de 30,4% des cas en Australie et Nouvelle- Zélande (Yu *et al.*, 2002). Le mode de transmission de *L. longbeachae* reste plus flou, le

contact avec des composts ou des terreaux pourrait être un facteur de risque (Whiley and Bentham, 2011).

Les populations les plus sensibles à la légionellose sont les personnes âgées ainsi que les personnes immuno-déprimées, bien que la légionellose puisse survenir chez des personnes apparemment en bonne santé et de tout âge (Borella *et al.*, 2005). Les autres facteurs de risques individuels sont le sexe masculin, le tabagisme, l'alcoolisme, le diabète et les maladies du système respiratoire et cardiovasculaire (Benhamou *et al.*, 2005).

2.3.Epidémiologie

En France, la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987 (Benhamou *et al.*, 2005), décret n° 87-1012. Le taux d'incidence de la maladie est estimé à 2 cas pour 100 000 aux USA (Borella *et al.*, 2005), en France ce taux est de 2,5 pour 100 000 pour les années 1997-2005 mais il est redescendu à 2 pour 100 000 en 2008 (Campese *et al.*, 2010; Hartemann and Hautemaniere, 2011). D'après l'Invs (Institut National de Veille Sanitaire), en 2011, 1170 cas ont été déclarés soit un taux d'incidence de 1,8 pour 100 000. La souche *L. pneumophila* Paris est la souche endémique en France, elle représente 12,7% des cas de légionellose et même 33% des cas en région parisienne (Cazalet *et al.*, 2004). La souche *L. pneumophila* Lens a été responsable de la plus grande épidémie en France qui est survenue entre novembre 2003 et janvier 2004 engendrant 86 cas et 17 décès (Cazalet and Buchrieser, 2005).

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).

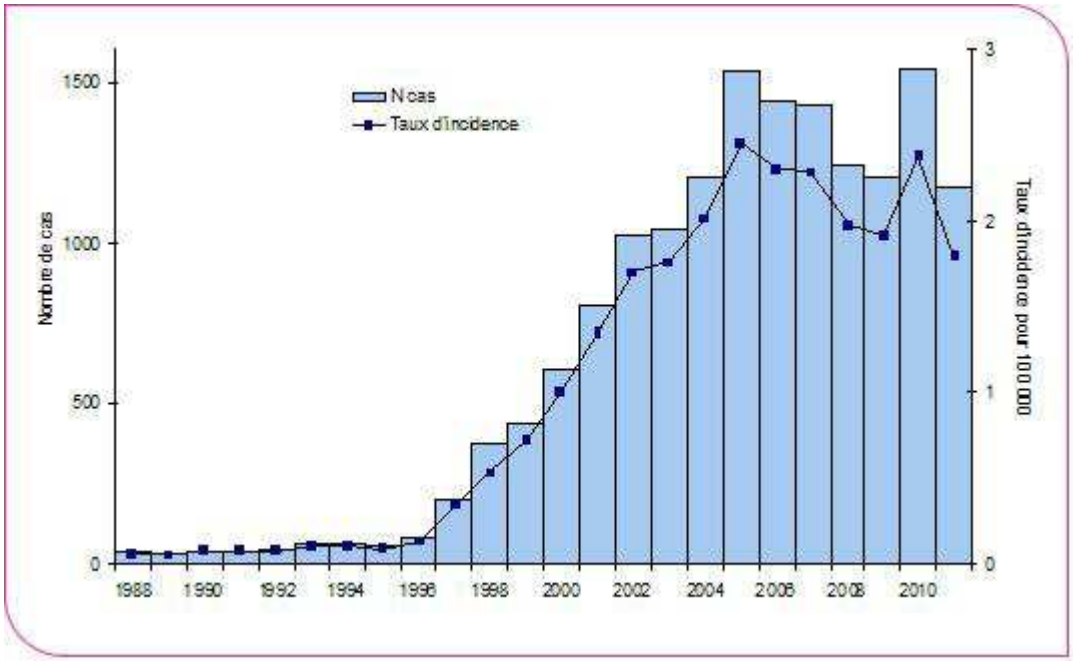


Figure 1 : Evolution du nombre de cas et du taux d'incidence de la légionellose en France, 1988-2011 (d'après InVS)

Le nombre de cas de Légionellose observé en 2011, en France, montre une tendance à la baisse depuis 2005 qui se poursuit malgré l'augmentation ponctuelle du nombre de cas en 2010, Figure 1. L'augmentation à la fin des années 90 et au début des années 2000 est due au renforcement du dispositif de surveillance à partir de 1997 et à la sensibilisation des professionnels de santé.

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.*, 2010). Au niveau Européen, durant la période 2009-2010, 59% des cas sont survenus entre les mois de juin et d'octobre (Beaute *et al.*, 2013). Une recrudescence du nombre de cas en période estivo-automnale est observée (Benhamou *et al.*, 2005). Cette période correspond au moment où les eaux sont les plus échauffées, et les Hommes plus exposés de part des activités récréatives et les usages de l'eau.

2.4.Traitements hospitaliers

L'érythromycine était l'antibiotique de référence depuis l'épidémie de 1976. Depuis lors, plusieurs antibiotiques ou familles d'antibiotiques actifs ont été mis à disposition. Les macrolides (roxithromycine, clarithromycine, spiramycine, josamycine), les azalides (azithromycine) et les quinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine, afloxacine) sont employés depuis (Benhamou et al., 2005). Les macrolides sont une famille d'antibiotiques capables de diffuser dans les tissus de l'organisme et à

l'intérieur des cellules ce qui en fait une famille bien adaptée au cycle de vie intracellulaire de *Legionella*. La capacité d'un médicament à inhiber ou à tuer les *Legionella* intracellulaires est généralement bien corrélée avec l'efficacité clinique (Diederen, 2008). Les azalides constituent une classe de macrolides contenant un azote dans le cycle macrolide ce qui leur confère une plus grande stabilité. Les quinolones forment une large classe d'antibiotiques de synthèse qui comprend les dérivés de l'acide nalidixique. La rifampicine est parfois utilisée mais son intérêt est discutable car il y a débat sur l'avantage supplémentaire qu'elle peut apporter (Diederen, 2008). L'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) indique que la rifampicine ne doit pas être utilisée en monothérapie. L'agence recommande en cas de forme commune de réaliser une monothérapie avec soit un macrolide ou soit avec une quinolone. En cas de forme sévère ou bien pour un patient immunodéprimé, elle recommande d'y associer deux antiobiotiques par voie IV (intra-veineuse). La durée du traitement est de 14 à 21 jours chez l'immunocompétent. Elle peut être allongée à 30 jours chez l'immunodéprimé ou dans les formes sévères (Benhamou et al., 2005). Ces antibiothérapies permettent de bien traiter les cas de légionellose, peu de résistances à ces traitements sont décrites.

3. Ecologie

Legionella est une bactérie ubiquitaire des environnements aquatiques dont il est difficile de prévenir la colonisation dans les systèmes anthropisés (Steinert *et al.*, 2002). A partir de ce constat, les différents habitats (naturels ou artificiels) dans lesquels la bactérie est rencontrée vont être décrits, puis un zoom à l'échelle microscopique sera fait sur la niche écologique qu'est le biofilm.

3.1. Habitats naturels

Legionella est une bactérie naturellement présente dans les environnements aquatiques. La bactérie 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°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°C), *Legionella* peut être présente à des concentrations trop faibles pour être détectée par méthode de culture. De telles

eaux peuvent potentiellement importer *Legionella* dans des réservoirs et réseaux où les conditions physiques et chimiques permettent leur développement (WHO, 2007).

L'écologie de *L. longbeachae* diffère quelque peu de celui de *L. pneumophila*. Le bacille est plutôt rencontré dans le sol et non dans l'eau. Des investigations menées en 1989 par Steele *et al*. ont identifié le terreau et donc le sol comme habitat de *L. longbeachae* (Steele *et al.*, 1990). Depuis lors, la bactérie a souvent été isolée à partir de terreaux frais ou de ses composants (Koide *et al.*, 2001; Whiley and Bentham, 2011), mais moins fréquemment dans les sols naturels indiquant que le compostage pourrait être un catalyseur pour la croissance (Whiley *et al.*, 2011).

3.2.Habitats anthropiques

Legionella est largement rencontrée dans les systèmes de distribution d'eau mais elle a également été isolée de fontaines décoratives, de spas, de piscines, de machines à glace, de brumisateurs de légumes, de pommeaux de douche, d'unit dentaires (Atlas, 1999; Steinert *et al.*, 2002). Mais c'est dans les systèmes d'air conditionné et les TAR que *L. pneumophila* est principalement isolée (Koide *et al.*, 1993). La température des eaux de tours de refroidissement est probablement un facteur important engendrant une augmentation de la population de *Legionella*. 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). Dans une étude de 2009, sur un total de 96 TAR examinées (hôtel, hôpitaux, installations sportives, centre 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 *Legionella* y est plus importante. De façon plus globale ces installations sont considérées par certains comme des « hot spot » pour l'émergence de pathogènes humains (Berk *et al.*, 2006).

Les réseaux d'eau domestiques peuvent également être contaminés par *Legionella*. Dans une étude réalisée par Borella *et al.* en 2004, 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*. Les concentrations dans ces réseaux peuvent s'avérer élevées puisque certains prélèvements (9,2%) contenaient plus de 10^4 UFC/Litre (Borella *et al.*, 2004). *Legionella* a également été isolée dans de nombreux circuits d'eau hospitaliers, et ce dès les années 80, comme le décrit l'étude menée par Hanrahan *et al.* qui rapporte une épidémie de légionellose due à la colonisation du réseau d'eau hospitalier par ce bacille (Hanrahan *et al.*, 1987). Une autre étude révèle que les eaux utilisées pour les soins de santé (hôpitaux, centre de réhabilitation, maison de retraite) peuvent également être contaminées par *Legionella*, 32% des 625 prélèvements se sont avérés positifs à *Legionella* dans leur cas (Arvand *et al.*, 2011). Les spas peuvent également être un habitat favorisant *Legionella* de par la

température à laquelle l'eau est chauffée. Une épidémie de fièvre de Pontiac due à *Legionella micdadei* est exposée par Fallon et Rowbotham à ce sujet (Fallon and Rowbotham, 1990).

Toutes ces études démontrent le caractère ubiquitaire de *Legionella* dans les environnements anthropiques. *Legionella* est susceptible d'être retrouvée et de se multiplier dans toutes les qualités d'eau (eau de réseau de distribution, eau de circuits de TAR, eaux naturelles). L'échauffement de l'eau naturelle des lacs et rivières pour des process industriels, des activités récréatives ou simplement pour la production d'eaux chaudes sanitaires permet aux légionelles de se multiplier, puis le cas échéant d'être diffusées sous forme d'aérosols dans l'atmosphère.

3.3.Association aux biofilms

Le biofilm peut être défini comme une communauté de microorganismes attachés à une surface (O'Toole *et al.*, 2000). Les cellules associées à un biofilm peuvent se différencier des cellules en suspension par la production d'une matrice extracellulaire polymérique, d'une réduction de croissance et diverses régulations génétiques (Donlan, 2002). La formation des biofilms est possible sur une large gamme de surface en contact avec l'eau et ce aussi bien pour des environnements naturels qu'artificiels. La formation d'un biofilm suit 3 grandes étapes : la fixation des cellules, la maturation du biofilm puis le décrochage partiel du biofilm libérant des cellules dans la phase circulante, Figure 2. Les micro-organismes forment un biofilm dans lequel un polymère d'exopolysacharides protège les cellules de conditions hostiles comme par exemple lors d'un traitement biocide (Morton *et al.*, 1998). Le biofilm facilite les échanges gazeux et nutritionnels. 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).

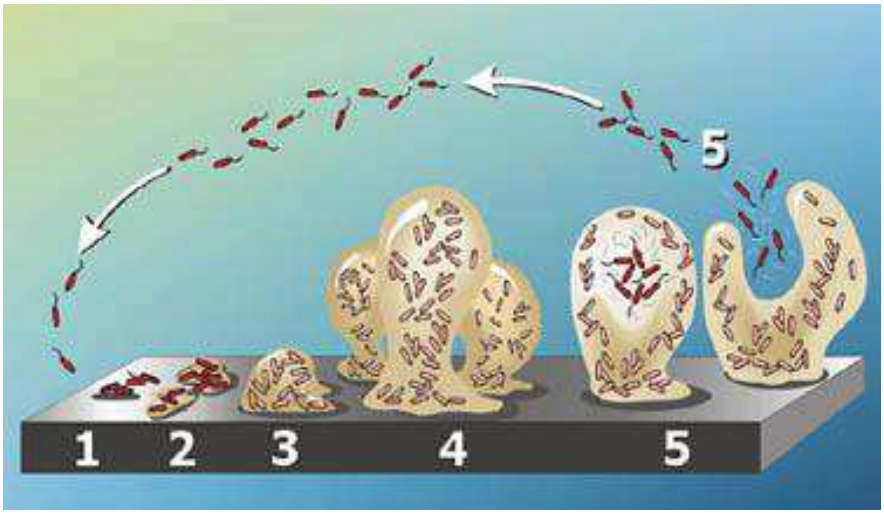


Figure 2 : Les 5 étapes de la formation d'un biofilm d'après Courtesy Peg Dirck et David Davies

Les cellules se déposent sur la *surface* (1) et adhèrent de façon « irréversible » (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).

Dans l'environnement, *Legionella* est rencontrée dans les biofilms. Ces biofilms représentent une niche écologique très répandue où ce pathogène survit et peut proliférer (Atlas, 1999; Taylor *et al.*, 2009). D'après une étude de 2004, *Legionella* représente moins de 1% de la biomasse totale dans un réseau d'eau domestique. Les légionelles colonisent le biofilm, puis une phase de stabilisation est constatée par la suite (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) (Wery *et al.*, 2008). La bactérie est plus facilement retrouvée dans les échantillons de biofilm que dans l'eau circulante (Fields *et al.*, 2002). En fait, selon certains auteurs, il est estimé que 95% des bactéries présentes dans un réseau d'eau le sont au niveau des surfaces, la phase circulante représente seulement 5 % de la biomasse restante (Declerck *et al.*, 2009; Flemming, 2002). Un modèle du développement de *Legionella* dans un réseau d'eau potable a été proposé par Lau et Ashbolt, Figure 3.

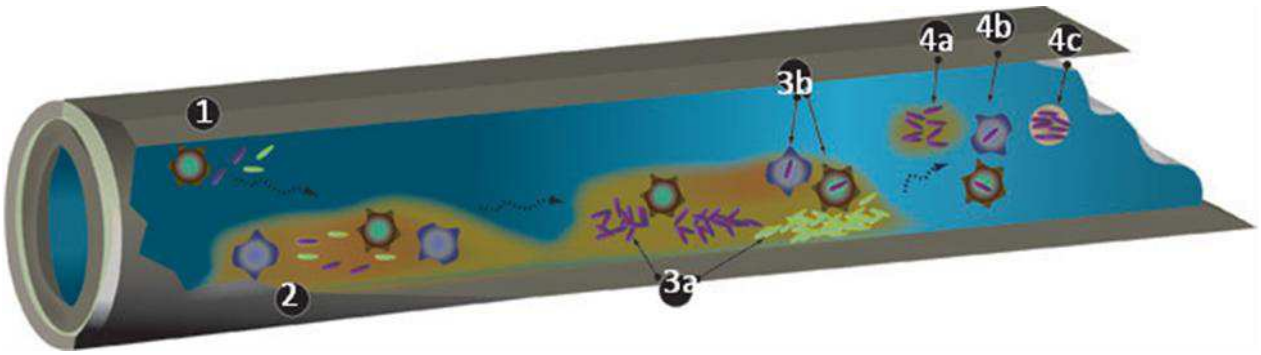


Figure 3 : Développement et relargage de *Legionella* spp. dans un réseau d'eau potable (Lau and Ashbolt, 2009)

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).

La présence de certains protozoaires, notamment des amibes, est un facteur clef dans le développement des populations de *Legionella* dans les réseaux. La prolifération rapide de *L. pneumophila* est probablement associée à une multiplication intra-amibienne. Le modèle proposé par Lau et Ashbolt fait intervenir des interactions entre les protozoaires du biofilm permettant la réplication et le maintien des *Legionella* dans les réseaux, Figure 3. Outre les amibes, d'autres protozoaires comme *Diphylleia rotans* ou bien *Rhinosporidium* spp. pourraient être des hôtes pour *Legionella* (Valster *et al.*, 2010). La bactérie est capable de s'implanter dans le biofilm puis de s'y multiplier grâce à la présence d'amibes comme par exemple *H. vermiformis* (Murga *et al.*, 2001). Selon Kuiper *et al.*, 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 (Kuiper *et al.*, 2004). L'idée d'une survie des légionelles dans les biofilms mais d'une nécessaire présence de cellules hôtes, comme par exemple des amibes, pour la prolifération de *Legionella* a été récemment soutenue par d'autres auteurs. Declerck et *al* indiquent en 2009, 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 (Declerck *et al.*, 2009). *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 di-peptide 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.*, 2009). 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.*, 2006). Lau et Ashbolt décrivent également la survie de *L. pneumophila* dans des biofilms métaboliquement inactifs, associée à des cellules microbiennes (Lau and Ashbolt, 2009). Récemment, Taylor *et al.*, ont suggéré la persistence de *Legionella* dans un état de dormance dans les biofilms après des périodes de multiplication intracellulaire. Cependant des périodes limitées de croissance extracellulaire pourraient avoir lieu localement dans le biofilm lorsque les conditions nutritionnelles sont favorables (Taylor *et al.*, 2013).

En résumé, *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).

4. Cycle de vie biphasique

Dans ce paragraphe, le cycle vie biphasique de la bactérie qui lui permet de s'adapter à son environnement va être présenté. L'association amibes-légionelles ainsi que les processus génétiques et protéiques qui y sont associés donneront lieu à un chapitre ultérieur qui interviendra après une description bibliographique des amibes.

Comme précédemment indiqué, dans l'environnement, il semblerait que *Legionella* se réplique principalement grâce à la présence de cellules hôtes. Le biofilm n'étant qu'une niche écologique abritant légionelles et cellules hôtes. Par ailleurs, en réponse aux conditions environnementales et nutritionnelles fluctuantes *Legionella* est capable de variations phénotypiques (Taylor *et al.*, 2009). Cette variabilité de réponse est essentielle pour *Legionella* car elle permet l'adaptation de la bactérie aux conditions environnementales et sa multiplication dans des cellules hôtes. La régulation des modifications phénotypiques est orchestrée par une régulation génétique elle-même mise en place selon le cycle de vie de la bactérie. Ce cycle présente deux phases différentes, une phase réplicative et une phase transmissive, ce cycle est représenté Figure 4. La phase transmissive est observée lors de la sortie des cellules hôtes ou bien lors de la phase stationnaire dans un modèle de culture liquide. La phase réplicative correspond à la phase de multiplication dans les cellules hôtes ou bien à la phase exponentielle en milieu de culture artificiel (Molofsky and Swanson, 2004).

Les *Legionella* en phase réplicative sont non flagellées, faiblement cytotoxiques avec une faible résistance au stress et peuvent être filamenteuses. A l'inverse les légionelles en phase infectieuse (sortie de la cellule hôte) sont flagellées et mobiles, cytotoxiques, résistantes au stress, de petites tailles

et présentent une paroi plus épaisse (Steinert *et al.*, 2002). Des grains de β-hydroxybutyrate (réserve de nutriments) sont présents en plus grande quantité dans les cellules en phase transmissive, l'expression génétique et protéique est également modifiée (Swanson and Hammer, 2000).

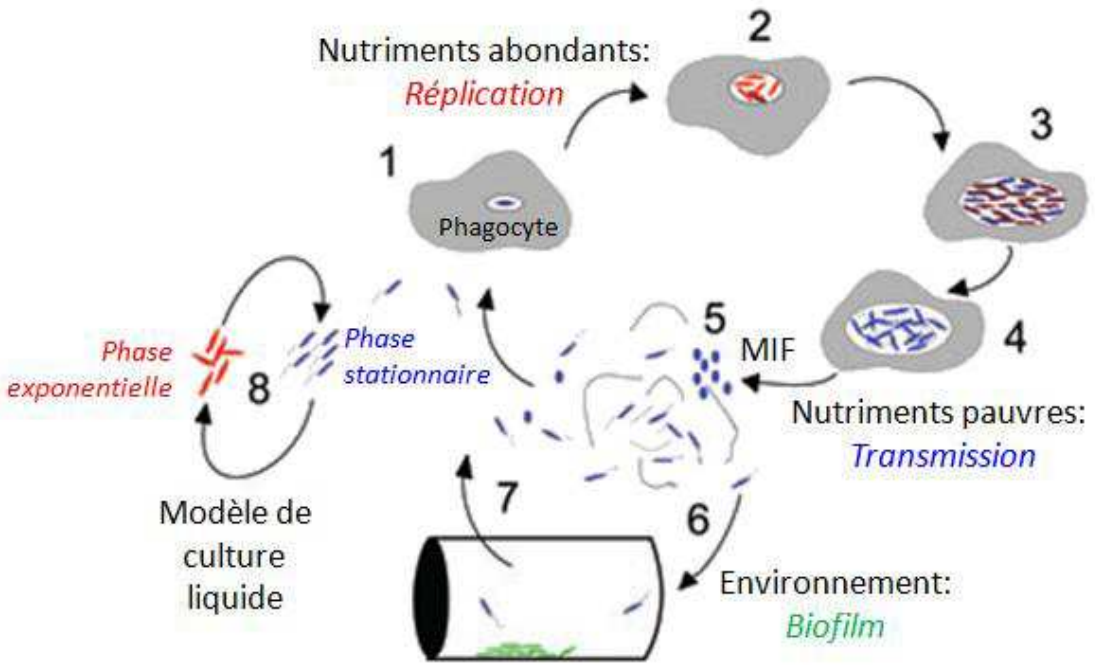


Figure 4 : Cycle de vie de *L. pneumophila* (Molofsky and Swanson, 2004).

L. pneumophila sous forme transmissive est phagocytée (1), lorsque les conditions sont favorables, la bactérie se réplique, les traits de transmission sont réprimés (2). *L. pneumophila* termine sa réplication, les traits de transmission sont de nouveau exprimés et une forme particulière, hautement résistante et infectieuse (MIF) peut apparaître (4). La cellule hôte est lysée (5), le bacille peut alors aller se loger dans un biofilm où elle peut rencontrer une nouvelle cellule hôte et démarrer un nouveau cycle (7).
La bactérie en culture liquide peut également exprimer les facteurs de la phase réplicative et transmissive lors des phases exponentielle et stationnaire, respectivement (8).

Chez *Legionella* le passage en phase stationnaire intervient dès lors que les réserves en nutriments sont épuisées. Il est coordonné par un circuit de régulation dont le signal d'alarme est le (p)ppGpp (Guanosine pentaphosphate ou tetraphosphate) (Molofsky and Swanson, 2004). L'entrée en phase stationnaire va engendrer l'expression de caractères physiologiques promouvant la transmission à un nouvel hôte (augmentation de l'infectiosité, augmentation de la virulence) (Cirillo *et al.*, 1994; Cirillo *et al.*, 1999). A l'échelle génétique, c'est l'activation de (p)ppGpp qui entraîne l'activation de facteurs sigma alternatifs RpoS, FliA et probablement RpoN. Le contrôle post-transcriptionnel est médié par deux systèmes de régulation LetA/S et une protéine se liant à l'ARNm CsrA (Hammer *et al.*, 2002; Molofsky and Swanson, 2003, , 2004).

Le rôle de CsrA (répresseur de la traduction de l'ARNm) comme régulateur de gènes pouvant contribuer à la capacité du pathogène à s'adapter rapidement à son environnement a été mis en lumière par Fettes *et al.*. Une surexpression de CsrA entraîne une réduction de la flagellation, de la

pigmentation et une augmentation de la taille de la bactérie (Fettes *et al.*, 2001). L'action de CsrA a été confirmée plus tard par Molosky et Swanson comme un répresseur des caractères de phase transmissive et un activateur de réplication (Molofsky and Swanson, 2003). Le rôle de régulation de RpoS, facteur qui coordonne l'expression de caractères en phase stationnaire, a été décrit par Bachman et Swanson en 2001. L'activation de RpoS confère la sensibilité au sodium, active la mobilité et la capacité à sortir de la cellule hôte (Bachman and Swanson, 2001). Quant à FliA, il contrôle l'expression du flagelle et est corrélé à l'efficacité d'infection de la cellule hôte (Byrne and Swanson, 1998; Pruckler *et al.*, 1995).

Au travers de la régulation de ces différents facteurs, il apparaît clairement que *Legionella* a un cycle de développement intégré à son mode de vie. *Legionella* est capable de s'adapter à son environnement grâce à ces régulations qui sont mises en place en réponse aux conditions du milieu et de la présence ou non de cellules hôtes. Ce cycle biphasique est au centre de la pathogénicité et de l'écologie de cette bactérie pathogène intra-cellulaire pourvue d'une phase de vie extracellulaire. Garduño conclut à ce sujet que : « *la forme hautement infectieuse et résiliente dans l'environnement qui survit à de longues périodes de famine en eau douce constitue un caractère évolué par la légionelle qui est devenue une partie intégrante de son histoire naturelle* ». (Garduno *et al.*, 1998).

5. Méthodes de détection et de quantification

Cette partie a pour but de présenter dans les grandes lignes des méthodes de détection et de quantification de *Legionella*. Cette partie abordera les méthodes classiques basées sur la culture ainsi que les méthodes plus récentes de biologie moléculaire et se terminera par une comparaison entre la méthode de culture et la méthode de PCRq.

5.1. 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'α-cétoglutarate est décrit comme un activateur de la croissance de *Legionella,* cependant il n'est pas toujours employé. La mise au point de ce milieu n'a pas été immédiate, initialement McDade avait isolé *Legionella* sur le milieu Mueller-Hinton complémenté avec 1% d'hémoglobine et 1% d'IsoVitaleX. Les composés essentiels au BCYE

ont été définis par Feeley *et al.* qui ont déterminé que la L-cystéine et le pyrophosphate de fer soluble pouvait remplacer, respectivement, l'IsoVitaleX et l'hémoglobine. Les conditions optimales de croissance de *Legionella* sont un pH de 6,9 et une température de 35°C (Feeley *et al.*, 1979), mais la gamme de température de croissance s'étend de 25 à 42°C (Fields *et al.*, 2002).

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 Gram – et celle de la plupart des Gram +. 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 pré-traitement 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 (Lipo-PolySaccharide) peut être ensuite utilisé afin de confirmer l'appartenance de la colonie testée au genre *Legionella*. La détermination du sérogroupe (sérogroupe 1 ou sérogroupes 2 à 14) est également possible par ce test. Néanmoins, des réactions croisées, lors de ce test d'agglutination au latex, avec d'autres micro-organismes sont possibles comme par exemple avec *Capnocytophaga ochracea* (Chen *et al.*, 1994).

5.2.Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes plus récentes basées sur la biologie moléculaire se sont développées au cours des dernières décennies. Ces méthodes sont la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la PCRq (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*), la méthode FISH (*Flurorescence 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 à minima limiter les sous-estimations lors des quantifications dues aux bactéries non cultivables voire éviter les pertes dues aux étapes de concentration si les méthodes moléculaires utilisées sont assez sensibles pour se passer de ces étapes.

La méthode PCR pour *Legionella* a été décrite la première par Mahbubani *et al.*, 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* (*Macrophage Infectivity Potentiator*) (Mahbubani *et al.*, 1990). Le rôle de ce gène sera abordé dans le chapitre relation amibes-légionelles. L'année suivante, une méthode de PCR

dont l'objectif est de faire le distinguo entre cellule viable et non viable a été mise au point par Bej *et al.* 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 TAR industrielles ou d'hôpitaux, eaux de cliniques, eaux de réseaux domestiques (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.* qui, les premiers ont constaté 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 de 2007 indique un taux détection de *Legionella* spp. dans des installations de réseaux d'eau potable de 2,2% par culture et de 87,1% par PCR (Diederen *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 les détecter. Les amorces utilisées en PCRq ont les mêmes cibles que pour la PCR à savoir le gène *mip* pour *L. pneumophila* et un gène de la sous-unité ribosomique pour *Legionella*. Joly *et al.* décrivent des amorces de PCRq, ils utilisent, 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.*, 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 (Yaradou *et al.*, 2007). Afin d'améliorer ce dernier point, 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, est décrite par plusieurs auteurs (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. Des étapes de validation sont cependant encore nécessaires avant d'utiliser cette méthode pour suivre les populations de *Legionella* dans les échantillons naturels.

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*. 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). Auparavant des sondes spécifiques aux *Legionellacae* (LEG226 et LEG705) ont été mises au point dans le but d'examiner et de comprendre l'écologie de ces bactéries directement dans leur environnement (Manz *et al.*, 1995). Un des problèmes qui se pose pour l'utilisation de la méthode FISH pour identifier et quantifier *L. pneumophila* et *Legionella* spp. dans des échantillons cliniques ou environnementaux est la perte de fluorescence rapide des fluorochromes utilisés, comme par exemple le CY3 (tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), qui sont couplés aux sondes (Declerck *et al.*, 2003). Afin de remédier à ce problème, la méthode CARD-FISH (*Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization*) a été mise au point pour des cellules à faible contenu ribosomique ou des hybridations à faible signal de fluorescence. Le principe de la méthode est détaillé dans la Figure 5. Cette figure permet une comparaison entre la méthode FISH et la méthode CARD-FISH notamment lors de l'étape d'hybridation qui est sans intermédiaire lors du FISH alors qu'en CARD-FISH une étape supplémentaire est nécessaire. La méthode CARD-FISH a été utilisée récemment pour le développement d'un protocole de CARD-FISH pour la quantification de *L. pneumophila* et son application à des eaux de TAR d'hôpitaux. La méthode est, d'après les auteurs, rapide, sensible, tout en permettant une détection spécifique et une quantification de *L. pneumophila* dans ce type d'eau (Kirschner *et al.*, 2012).

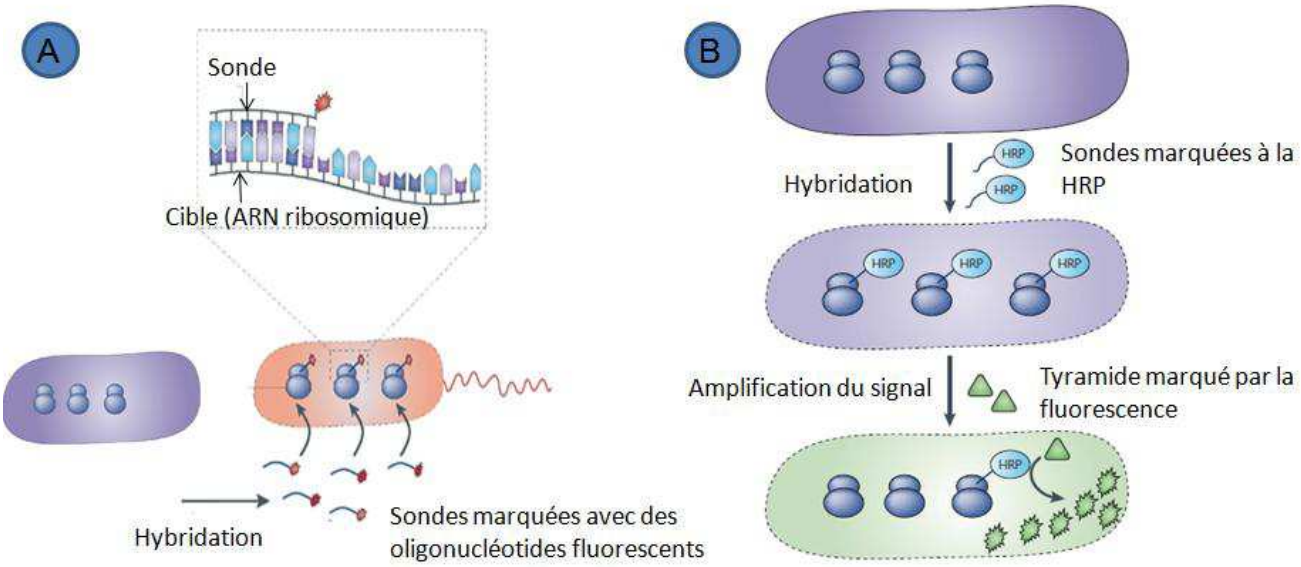


Figure 5 : Principe de l'hybridation en méthode FISH (A) et en méthode Card-FISH (B) (Amann 08)

L'hybridation des sondes marquées avec des oligonucléotides fluorescents est directe en méthode FISH (A). En Card-FISH, les sondes ne sont pas marquées par des fluorochromes mais liées à l'enzyme HRP (*HorseRadish Peroxydase*). La sonde marquée à l'HRP est hybridée à l'acide nucléique et des tyramides sont ajoutées par la suite (B). Les tyramides sont des composés phénoliques qui se lient à des protéines dans la cellule. Cette réaction permet d'augmenter le signal d'hybridation.

5.3. Bilan de la méthode classique et des méthodes de PCRq pour la détection et quantification de *Legionella*

Au final les méthodes de culture restent actuellement les méthodes de référence pour la recherche et le dénombrement des légionelles lors des contrôles réglementaires d'un grand nombre d'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 récemment (avril 2010). Le Tableau 1 synthétise les avantages et les inconvénients, d'après l'ANSES, 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. De plus, les eaux chargées représentent toujours des échantillons complexes à traiter, quelle que soit la méthode normalisée utilisée.

Tableau 1 : 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 *L. pneumophila*	+	+
Quantification de *L. pneumophila* avec distinction sérogroupe 1	+	+
Prise en compte des *Legionella* intra-amibienne ou intra-vésiculaires	-	+
Non détection des *Legionella* mortes	+	-
Détection de l'ensemble des *Legionella* 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 *L. pneumophila* autre que sg 1	+	**?**
Quantification de l'ensemble des *Legionella* 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

AMIBES LIBRES

Dans ce chapitre sera abordé une description des amibes libres et de leur classification ainsi que l'aspect pathogène de certaines de ces amibes. Un point sur leur biologie et leur écologie sera effectué, ensuite, en se focalisant plus particulièrement sur les amibes des genres *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella* qui sont les genres amibiens utilisés lors de notre étude. Une dernière partie sera consacrée aux méthodes utilisées pour la détection et la quantification des amibes dans l'environnement, notamment les méthodes de PCR en plein essor ces dernières années.

6. Généralités

Le terme amibe regroupe un grand nombre de protozoaires. Ce terme fait référence à un groupe hétérogène d'eucaryotes unicellulaires anciennement classés dans le groupe des protozoaires qui se meuvent en rampant sur les surfaces et ayant comme point commun une forme amiboïde. La distinction entre amibes libres et amibes parasitaires est basée sur le fait que les amibes libres ne dépendent pas d'un hôte pour leur multiplication et leur propagation. Les amibes libres ne sont pas bien adaptées au parasitisme, elles tueraient presque invariablement leur hôte au lieu d'évoluer avec eux (Schuster and Visvesvara, 2004). En outre, elles sont largement répandues dans la nature, la transmission d'hôte à hôte des maladies qu'elles engendrent n'est pas avérée (Schuster and Visvesvara, 2004). Néanmoins, la frontière est mince pour certaines amibes qui ont la capacité de survivre au sein d'un hôte mammifère et sont également capables d'avoir une existence libre. Elles sont alors appelées amibes amphizoiques. Parmi elles, se trouvent *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea.*

6.1.Historique

La découverte des amibes ne fut guère au début qu'une curiosité, jusqu'au jour où deux naturalistes, Dujardin et Hugo Mohl, presque en même temps, appelèrent l'attention sur des animaux à substance gélatineuse sans tégument, qui avaient tous les caractères de la substance des amibes. Dujardin la dénomma *sarcode* ; Hugo Mohl s'arrêta quelques mois après, au nom de *protoplasma* qui a prévalu (revue des 2 mondes, 1892, tome 111). C'est dans la première partie du XXème siècle que les amibes libres furent mieux identifiées. L'amibe *Amoeba polyphagus* a été isolée à partir de poussière par Pushkarew en 1913. Volkonsky créa le terme d'*Acanthamoeba* en 1931 et en 1930 Castellanii a isolé une amibe d'une contamination dans une culture de levures qui a été ensuite nommée *Acanthamoeba*

castellanii (Visvesvara *et al.*, 2007). Depuis, de nombreuses autres espèces d'amibes ont été décrites notamment pour le genre *Acanthamoeba* qui en compte plus de 24.

6.2.Classification

Les amibes forment un groupe polyphylogénétique avec des groupes provenant de différentes branches et dérivant d'un ancêtre commun (Schuster and Visvesvara, 2004). La classification classique divisait les protozoaires en 4 groupes : Sarcodina (amoebae), Mastigophora (flagellates), Sporozoa (groupe correspondant à la plupart des amibes parasites) et Infusoria (ciliés). Cette classification a été abandonnée au profit d'une approche plus moderne basée sur l'ultrastructure des cellules, les voies biochimiques et la phylogénétique moléculaire. La classification a été révisée par un consortium de biologistes (Adl *et al.*, 2005). Les eucaryotes ont été classés en 6 super-groupes. Les amibes sont réparties dans plusieurs de ces super-groupes. *Acanthamoeba* et *Balamuthia* ont été placées dans le super-groupe des Amoebozoa, puis au sein de l'embranchement Acanthamoebae avec comme caractéristiques morphologiques un glycocalyx mince, des pseudopodes souples et effilés ainsi que des kystes à double paroi pour la plupart des espèces. Par ailleurs, les amibes du genre *Acanthamoeba* peuvent être classées en différentes lignées évolutives grâce à une méthode basée sur les séquences de l'ARN ribosomal 18S qui possèdent des régions variables. Stothard *et al.* décrivirent 8 de ces lignées (T5 à T12) (Stothard *et al.*, 1998). Le nombre de ces lignées a depuis continué d'augmenter, le génotype T17 a été décrit récemment (Nuprasert *et al.*, 2010), un 18ème génotype a été présenté lors du dernier congrès FLAM (*Free Living Amoebae Meeting*) en 2011 par Qvarnstrom *et al.*. Par ailleurs, *Sappinia* a également été placée dans le même super-groupe mais au sein de l'embranchement des Flabellinea (rang 1) puis Thecamoebidae (rang 2). Les Thecamoebidae ne possèdent pas de sous pseudopodes. *Hartmanella* a également été rangée dans ce super-groupe mais au sein de l'embranchement des Tubulinea (rang 1) puis des Tubulinida (rang 2). Quant à *Naegleria*, elle a été rangée dans le super-groupe des Excavata puis au sein de l'embranchement Heterolobosia (rang 1) puis Vahlkamfiidae (rang 2) avec comme caractéristique la présence d'une forme flagellée. La classification des genres *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria* est schématisée dans la Figure 6. La classification des amibes montre à quel point le terme amibe regroupe de nombreux protistes différents et variés et conforte l'image d'un groupe polyphylétique.

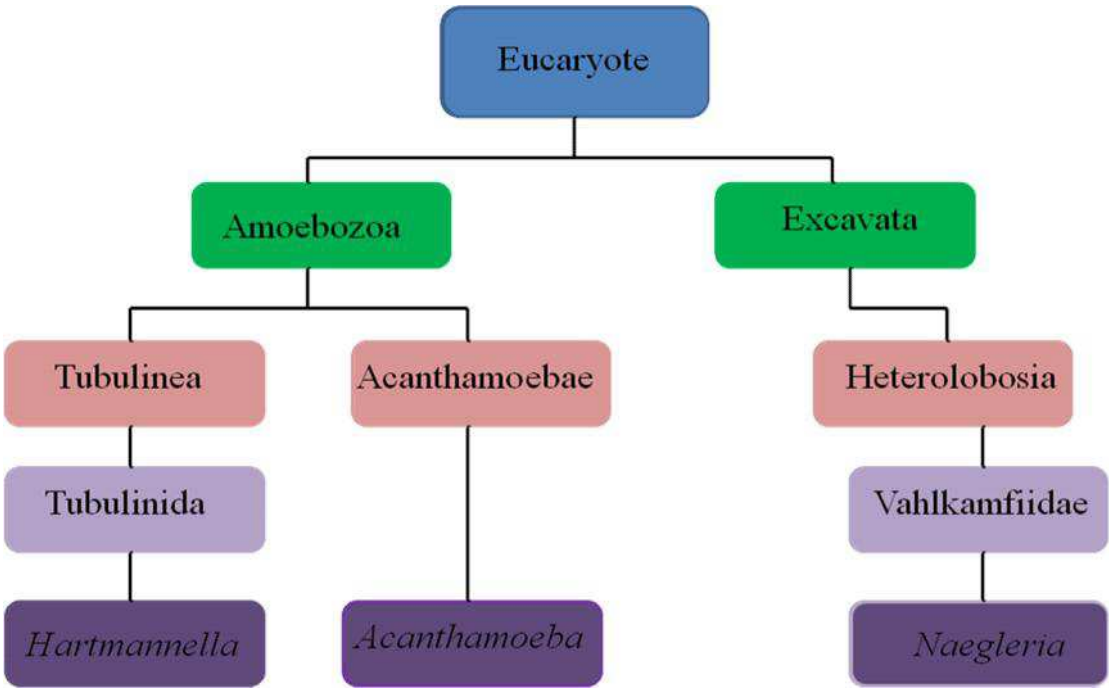


Figure 6 : Classification des genres *Hartmannella*, *Acanthamoeba* et *Naegleria* adaptée (Adl *et al.*, 2005)

Récemment, le séquençage des génomes amibiens de *N. gruberi* (Fritz-Laylin *et al.*, 2010) et *A. castellanii* (Clarke *et al.*, 2013) a été réalisé. Ces séquençages vont servir de point de départ pour de futures comparaisons avec d'autres génomes. Ils devraient également aider à déchiffrer la biologie de ces amibes, faciliter les études de génomiques fonctionnelles sur ces amibes mais également mieux comprendre l'évolution des eucaryotes et peut-être permettre de réviser et faire évoluer la classification des amibes.

6.3.Pathogénicité

Les amibes libres peuvent s'avérer pathogènes pour l'Homme. Dans la littérature, les amibes du genre *Acanthamoeba*, *Balamuthia* ainsi que certaines du genre *Naegleria* (*N. fowleri*) sont décrites comme pathogènes pour l'Homme (Schuster and Visvesvara, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007). La pathogénicité des amibes libres a été décrite par Culberston *et* al. en 1968. Un isolat d'amibes du genre *Acanthamoeba* a alors été incriminé comme étant pathogène pour des souris et des singes (Culberston *et al.*, 1968). Chez l'Homme, le premier cas a été attribué à *Naegleria* avant 1968 par Fowler et Carter. Ils décrivent la probable implication de cette amibe dans un cas de méningite chez un enfant australien de 9 ans en 1961 (Fowler and Carter, 1965).

6.3.1. Acanthamoeba

Certaines amibes du genre *Acanthamoeba* sont capables d'affecter le système nerveux central et de causer une encéphalite amibienne granuleuse (Schuster, 2002). L'amibe attaque les tissus du cerveau et entraîne des lésions nécrotiques hémorragiques (Schuster and Visvesvara, 2004). Le diagnostic est le plus souvent post-mortel. Les personnes ayant un système immunitaire affaibli (séropositifs, alcooliques) sont plus prédisposées à ces infections opportunistes. La voie de contamination intra-nasale semble la plus probable, l'amibe une fois entrée dans la cavité nasale migre directement vers le système nerveux central. La voie hématogène (par le sang) est également possible, l'amibe entre alors dans le système sanguin par une lésion au niveau de la peau.

L'autre infection, plus commune, engendrée par les amibes du genre *Acanthamoeba* est la kératite amibienne. Les premiers symptômes sont une douleur, un larmoiement excessif, une rougeur des yeux et une photophobie (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013). Généralement un seul œil est atteint (Schuster and Visvesvara, 2004). Les personnes portant des lentilles sont les plus exposées à ce risque d'infection. Un entretien non suffisant des lentilles de contact et de faibles précautions sanitaires entraînent le risque de voir *Acanthamoeba* se développer dans les solutions ophtalmiques. L'amibe est ensuite transférée sur la surface de la cornée lors de la mise en place de la lentille (Schuster, 2002). L'augmentation du nombre de personnes portant des lentilles est sans doute l'explication du nombre grandissant de cas de kératites amibiennes à travers le monde. Par ailleurs, les *Acanthamoeba* du type T4 sont celles dont le génotype est le plus fréquemment rencontré dans les cas de kératite (Schroeder *et al.*, 2001).

6.3.2. Naegleria fowleri

N. fowleri est associée à la MEAP (Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive), une infection fulminante, rapide et mortelle du système nerveux central (Schuster, 2002). *N. fowleri* est l'agent responsable de la MEAP chez l'Homme, même si d'autres espèces sont pathogènes chez la souris (*N. australiensis* et *N. italica*). Le premier cas reconnu de MEAP a été rapporté en Australie en 1965, mais il fut associé à *Acanthamoeba*. C'est aux USA l'année suivante que le terme MEAP est apparu et que le premier cas lié à *N. fowleri* a été identifié (Visvesvara and Schuster, 2008a). La pathologie affecte principalement les enfants, les adolescents et les jeunes adultes fort probablement à cause de leur mode d'exposition (jeux d'eaux, baignade prolongée) (Schuster and Visvesvara, 2004).

6.3.3. Balamuthia spp.

Balamuthia est une autre amibe libre qui cause des encéphalites amibiennes granulomateuses. Comme pour *Acanthamoeba* la plupart des diagnostiques sont post-mortels. Les personnes les plus sensibles sont les personnes immuno-déprimées mais les jeunes enfants et les personnes âgées peuvent être atteintes également (Visvesvara and Schuster, 2008b). Au sein de ce genre, seule l'espèce *B. mandrillaris* est connue pour entraîner des cas d'encéphalites amibiennes granuleuses chez l'Homme et chez les animaux (Visvesvara *et al.*, 2007).

6.3.4. Sappinia diploidea

Le genre *Sappinia* comporte deux espèces : *S. pedata* et *S. diploidea*. Gelman et al. rapportent le premier et unique cas d'encéphalite amibienne causé par *S. diploidea* (Visvesvara *et al.*, 2007; Walochnik *et al.*, 2009). Le patient était âgé de 38 ans et avait les symptômes d'une sinusite. Une IRM (Imagerie à Résonance Magnétique) révéla la présence d'une masse de 2 cm au niveau du lobe temporal gauche. L'observation de la masse après excision montra une inflammation hémorragique nécrotique dans laquelle les amibes s'étaient logées.

La description des infections causées par ces amibes libres pathogènes démontre le risque qu'elles représentent en santé publique. Les maladies qu'elles peuvent engendrer sont graves, parfois mortelles ou bien peuvent laisser de graves séquelles. D'après Schuster et Visvesvara, jusqu'en 2000, le nombre de cas d'encéphalite amibienne granuleuse attribué aux amibes du genre *Acanthamoeba* était d'environ de 200, pour *B. mandrillaris* ce nombre était supérieur à 100, un seul cas pour *S. diploidea* comme nous venons de le voir précédemment et environ 300 cas de MEAP pour *N. fowleri*. Enfin, plus de 3000 cas de kératites ont été attribués à des amibes du genre *Acanthamoeba* (Schuster and Visvesvara, 2004).

7. Biologie

7.1. Morphologie et cycle de vie

La plupart des amibes libres présentent à minima deux stades de développement, le trophozoite et le kyste. Le trophozoite est la forme métaboliquement active qui se nourrit de bactéries et qui est capable de se multiplier par mitose. Il n'y a pas de reproduction sexuée décrite. Le taux de réplication des amibes peut être très rapide, Fritz-laylin *et al.* rapportent un temps de 1,6 heure pour *N. gruberi* (Fritz-Laylin *et al.,* 2010). L'ultrastructure du trophozoite ne diffère pas considérablement de celle de cellules de mammifères (Bowers and Korn, 1968). Le cytoplasme est granuleux et contient de

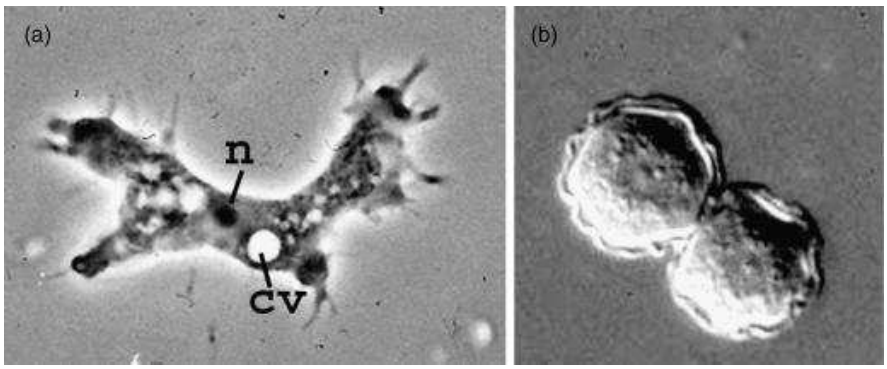
nombreuses mitochondries, ribosomes et des vacuoles qui servent de réserve de nutriments (Visvesvara *et al.*, 2007). Les figures 7a, 8a et 9 (1,2) présentent des photos de trophozoites d'*Acanthamoeba*, de *Naegleria* et d'*Hartmannella*, respectivement, illustrant la morphologie de ces trophozoites.

Le kyste est la forme de dormance, métaboliquement peu actif, permettant aux amibes de survivre lors de conditions environnementales défavorables (pH, pression ionique, températures défavorables ou carence en nutriment) (Fouque *et al.*, 2012). Les deux événements qui interviennent lors de la différenciation morphologique sont l'enkystement et le désenkystement (Chavez-Munguia *et al.*, 2007). Récemment, Fouque *et al.*, ont décrit des mécanismes de l'enkystement. L'enkystement est associé à des modifications morphologiques et physiologiques liées à la synthèse de protéases, d'actine, d'énolase, de cellulose et d'une protéine appelée CSP21 (*Cyst Specific Protein*) produite lors des premiers stades de l'enkystement (Barrett and Alexander, 1977; Fouque *et al.*, 2012). Le kyste est généralement composé de deux parois : 1'endokyste et l'ectokyste. Une troisième paroi, le mésokyste est présent chez certaines espèces, comme pour *B. mandrillaris*. Pour *Acanthamoeba*, lors de l'enkystement trois stades morphologiques ont été identifiés par microscopie à balayage : le pré-kyste, le kyste immature et le kyste mature (Chavez-Munguia *et al.*, 2013).

La composition de la paroi des kystes est variable. Chez les amibes du genre *Acanthamoeba*, le kyste est constitué de deux parois riches en cellulose notamment pour l'ectokyste, Figure 7b (Linder *et al.*, 2002). Barret *et al.* fournissent en 1977 une première estimation quantitative de la composition de la paroi kystique de ces amibes. Elle serait composée de 36 à 45% de protéines et de 20 à 34% de carbohydrates (Barrett and Alexander, 1977). Une étude plus récente apporte des précisions quant à la composition des kystes d'*A. castellanii*. Les résultats de cette étude confirment la présence de nombreux sucres avec un fort pourcentage de galactose et de glucose avec un peu de mannose et de xylose dans la paroi kystique. La présence de liaisons glycosidiques β 1-4 entre les sucres indique la présence de cellulose qui est un polymère de sucre (Dudley *et al.*, 2009). Cette structure compacte qu'est la paroi du kyste d'*Acanthamoeba* joue vraisemblablement un rôle pivot quant à la résistance particulière des ces kystes aux conditions environnementales sévères y compris lors de fortes concentrations de biocides (Aksozek *et al.*, 2002; Lemgruber *et al.*, 2010). Ces kystes pourraient même conserver leur potentiel pathogène et redevenir viable après 5 ans au minimum (Lorenzo-Morales and Maciver, 2006).

D'autres amibes, principalement *Naegleria* spp ont également un stade flagellé, Figure 8b. Ce stade flagellé intervient lorsque les conditions du milieu ne sont plus optimales, lors de changement de la concentration ionique par exemple. La forme flagellée possède généralement 2 flagelles antérieurs mais 3 ou 4 flagelles peuvent être vus en même temps. Par contre, elle ne possède pas de cytostome

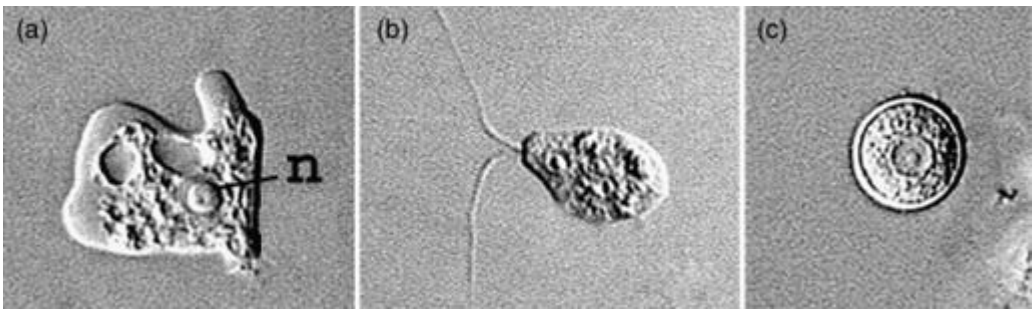
(orifice buccal) et par conséquent ce stade n'autorise pas la nutrition (Visvesvara and Schuster, 2008a).



N : noyau CV : vacuole contractile

Figure 7 : Trophozoite (a) et kyste (b) d'*Acanthamoeba castellanii*, grossissement X 1000 (Visvesvara *et al.*, 2007)

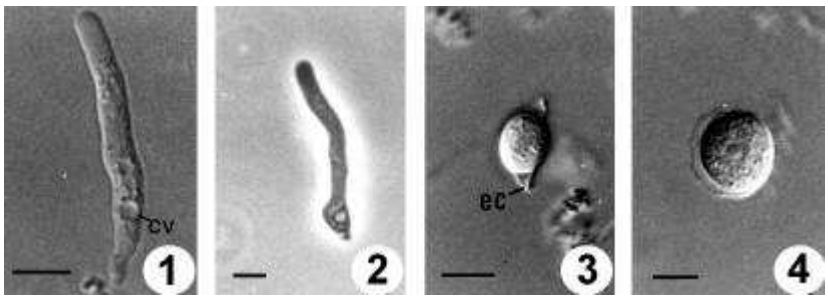
Les kystes de *Naegleria* sont sphériques et composés d'une double paroi (endokyste et ectokyte), Figure 8c (Visvesvara *et al.*, 2007). Cependant une étude plus récente affirme que ces kystes seraient en fait composés d'une seule paroi fibrillaire mince et irrégulière détachée en boucle (Chavez-Munguia *et al.*, 2009). La composition détaillée de ces kystes n'est pas décrite dans la littérature. Selon Linder *et al.*, ils contiendraient de la chitine et non pas de la cellulose (Linder *et al.*, 2002). Néanmoins, la coloration au calcofluor blanc M2R indique la présence d'un polysaccharide lié par une liaison β 1-4. Par cette technique il n'est pas possible de faire la différence entre la chitine et la cellulose à cause de la similarité des liaisons β 1-4 (Linder *et al.*, 2002). Bien qu'ils soient résistants, ces kystes sont moins résistants que ceux d'*Acanthamoeba* au stress environnementaux (par exemple la dessiccation) (Visvesvara *et al.*, 2007).



N : noyau

Figure 8 : Trophozoites (a), forme flagellée (b), et kyste (c) de *Naegleria fowleri,* grossissement X1000 (Visvesvara *et al.*, 2007).

Les kystes d'*Hartmannella* sont très peu décrits dans la littérature. Ces kystes possèdent une double paroi qui est visible dès le début de l'enkystement, Figure 9(4) (Smirnov, 1999). Ils seraient composés en grande partie de protéine avec du glucose en faible composition (Fouque *et al.*, 2012). Toute comme pour *Naegleria*, ces kystes ne semblent pas contenir de cellulose (Linder *et al.*, 2002).



CV : vacuole contractile EC : ectokyste échelle des barres: 10µm

Figure 9 : Trophozoites (1 et 2) et kystes (3 et 4) d'*Hartmanella vermiformis* (Smirnov, 1999)

7.2.Locomotion

Pour se mouvoir dans l'environnement, les amibes ont besoin d'un support pour adhérer (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Elles se déplacent alors grâce aux pseudopodes qui sont des déformations du cytosquelette. Les mouvements ainsi générés sont appelés mouvements amiboides. Ces mouvements sont rendus possibles grâce à deux types de cytoplasme : l'ectoplasme et l'endoplasme granulaire. Le mouvement de rétractation et d'extension des pseudopodes est dû au système actine-myosine (Puytorac *et al.*, 1987). Visvesvara *et al.* précisent que les trophozoites de *Naegleria* se déplacent rapidement grâce à des renflements hémisphériques entraînant une locomotion de type limace (Visvesvara *et al.*, 2007).

7.3.Nutrition

En dehors des modes de culture de laboratoire qui permettent le développement des amibes en milieu axénique (absence de micro-organismes), dans l'environnement, les amibes libres (*Acanthamoeba*, *Naegleria*) se nourrissent de bactéries (Opperdoes *et al.*, 2011; Visvesvara *et al.*, 2007; Visvesvara and Schuster, 2008b). Les bactéries sont la principale source nutritive dans l'environnement (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Toutefois, les amibes sont également capables de se nourrir d'autres micro-organismes tels que des champignons, des levures ou bien encore des algues. La digestion est effectuée au sein des phagolysosome (Greub and Raoult, 2004). Par contre, le mode de nutrition de *Balamuthia* n'est pas clair. En effet, cette amibe ne se développe pas sur les tapis bactériens classiquement utilisés pour la culture d'*Acanthamoeba* (Schuster, 2002).

Les amibes libres, qui sont des prédateurs dans les écosystèmes naturels, ont deux modes pour se nourrir : la phagocytose et la pinocytose (Khan, 2006). La phagocytose est leur principal mode de nutrition. Elle permet aux amibes d'ingérer des nutriments particulaires à l'aide de leurs pseudopodes qui sont des prolongements protoplasmiques. Ces pseudopodes vont entourer la particule qui va être incorporée au cytoplasme, entourée d'une membrane formant une vacuole appelée le phagosome. Le phagosome est ensuite maturé puis il fusionne avec un lysosome contenant les enzymes digestives permettant la dégradation de la particule. Quant à la pinocytose, il s'agit d'un mode de nutrition permettant l'ingestion d'éléments dissous, la cellule internalise alors des gouttelettes de fluides plutôt que des matières particulaires (Brandt and Pappas, 1960).

8. Ecologie

8.1. Répartition dans l'environnement

Les amibes libres sont présentes dans une large gamme d'environnements (Molmeret *et al.*, 2005; Rodriguez-Zaragoza, 1994). Elles vivent généralement à la surface des sédiments, sur les matières en suspension dans l'eau mais aussi dans les biofilms. *Acanthamoeba* est le genre amibien qui a été le plus étudié. Ces amibes ont été isolées du sol, d'eau douce et saumâtre, de bouteilles d'eau minérale, de circuits de TAR, de réseaux de chauffages, de ventilations, de systèmes d'air conditionnés, d'humidificateurs, de jacuzzi, dans des hôpitaux, d'units dentaires, de machines de dialyse…. (Visvesvara *et al.*, 2007). Les amibes libres des genres *Naegleria* et *Hartmannella* sont également ubiquitaires dans les environnements hydrotelluriques (Kuiper *et al.*, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007). D'après des études récentes de Kao *et al.*, la recherche des amibes du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria* dans différentes types d'eaux (rivière ou réseau) a montré leur présence dans 15% et 4% des échantillons, respectivement (Kao *et al.*, 2013a; Kao *et al.*, 2013b). Quant aux amibes du genre *Hartmannella*, une étude de Kuiper *et al.* en 2006, a montré leur présence dans 75% des 28 échantillons d'eaux de surface prélevés aux Pays-Bas avec des concentrations allant de 5 à 75 cellules par litre (Kuiper *et al.*, 2006).

Des amibes (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hatmannella* et *Vahlkampfia*) ont même été retrouvées dans le sol et des eaux en Antarctique (Brown *et al.*, 1982). L'abondance et la diversité des amibes dépendent de plusieurs facteurs : la saison, la température, la salinité ou bien encore la concentration bactérienne. Les amibes sont en général tolérantes pour des températures allant de 10 à 30°C (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Néanmoins, pour les amibes libres thermophiles telles que *N. fowleri* une température de 42°C est plus adaptée à son développement (Griffin, 1983). Certaines souches d'*Hartmannella* peuvent même résister à des températures supérieures à 48°C, quant à *Acanthamoeba* elle est très tolérante aux extrêmes (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Il n'est donc pas surprenant de retrouver les amibes du genre

Hartmannella prédominantes (65%) dans un système d'eau chaude hospitalière comme ce fût le cas lors de l'étude de Rohr *et al*. (Rohr *et al.*, 1998). Une étude récente investie par Garcia *et al*. a permis la détection des amibes libres (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria* et *Vannella*) dans 77% des échantillons collectés. Ces échantillons correspondaient à des prélèvements d'eau de réservoirs et de stations d'épurations (Garcia *et al.*, 2013). Cette étude confirme le caractère ubiquitaire des amibes libres.

Les amibes sont également retrouvées dans le sol. Dans le sol, la concentration en oxygène qui dépend entre autre de la porosité du sol est un facteur clef pour la distribution des amibes libres. Même dans les sols secs et désertiques, l'humidité relative est supérieure à celle de l'atmosphère et permet la survie de kystes (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Des amibes libres (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*) ont également été retrouvées dans l'air (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Cet environnement semble peu favorable pour ces micro-organismes, seuls des kystes y ont été retrouvés.

8.2.Présence dans les biofilms

La présence des amibes libres dans les biofilms est démontrée dans plusieurs études (Barbeau and Buhler, 2001; Murga *et al.*, 2001; Schuster and Visvesvara, 2004). Ces amibes participent à la formation et à l'équilibre des biofilms (Parry, 2004). Ces micro-organismes jouent également un rôle dans le cycle de l'azote et du phosphate notamment dans les environnements oligotrophes (Pickup *et al.*, 2007b). Parmi des amibes, les genres *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria* ont été retrouvées dans les biofilms des réseaux d'eau potable ou d'units dentaires par exemple. Les amibes libres sont associées aux biofilms bactériens dans de nombreux habitats naturels ou artificiels (Matz *et al.*, 2008). Le biofilm constitue un environnement particulièrement propice puisque leurs proies sont présentes en grand nombre (Rodriguez-Zaragoza, 1994). La prédation par les protozoaires est considérée comme une source majeure de la mortalité des bactéries dans les biofilms (Sherr and Sherr, 2002). Les amibes seraient capables de consommer 30 à 100% de la production bactérienne journalière (Sherr *et al.*, 1983). Dans une étude menée dans un pilote mimant un réseau d'eau domestique, Thomas *et al.*, ont pu dénombrer dans le biofilm, une densité amibienne de 40 cellules par cm^2 (Thomas *et al.*, 2004).

De part l'abondance de proies dans les biofilms, la population d'amibes peut considérablement augmenter (Barbeau and Buhler, 2001). En effet les amibes sont capables d'ingérer un grand nombre de bactéries dans un laps de temps réduit. D'après Goudot *et al.*, *N. fowleri*, dans des conditions de températures optimum (42°C), présente un temps minimum de génération de 3 heures (Goudot *et al.*, 2012). Mais pour cela le ratio bactéries/amibes doit être de 10^6 à 10^7. D'après Pickup *et al.*, pour *Hartmannella* et *Acanthamoeba*, à 20°C, le taux de croissance maximal, sur gélose, est d'environ 0,06

h^{-1} mais pour cela il faut des concentrations en bactéries supérieures à 10^7 proies par cm^2 (Pickup *et al.*, 2007a). Selon McBain *et al.*, ces concentrations sont des concentrations communes dans les biofilms. Selon ces auteurs, les concentrations bactériennes dans les biofilms sont de l'ordre de 10^{10} bactéries par gramme de biofilm. Une étude réalisée par Huws *et al.* en 2005, sur des biofilms générés sur des lames de verre, indique qu'*A. castellanii* est largement rencontrée dans ces biofilms adhérés aux surfaces. Dans cette étude, cette amibe a présenté un taux d'ingestion des bactéries, de 90 bactéries par amibe et par heure (Huws *et al.*, 2005). D'après certains auteurs, le taux de transformation de biomasse (rapport entre la masse de matière produite sur la masse de matière consommée) des amibes est plus élevé (40%) que celui des vertébrés et autres organismes multicellulaires (Anderson *et al.*, 1978; Rodriguez-Zaragoza, 1994). Néanmoins, un pseudo-équilibre finit par s'établir dans le biofilm entre prédateurs et proies ce qui amène des fluctuations chez les deux populations (Alexander, 1981). L'amibe sociale *Dictostelium discoideum* serait même capable de restreindre la consommation de proie lorsque celle-ci devient rare pour permettre à la ressource de se reconstituer (Brock *et al.*, 2011).

Les biofilms représentent donc une niche écologique favorable aux amibes. Ils permettent aux amibes de se fixer et de se déplacer pour « brouter », les bactéries, algues et autres micro-organismes nécessaires à leur développement. Ainsi la majorité de l'alimentation amibienne est réalisée par « paturâge » du trophozoite sur des bactéries adhérées à des surfaces (Pickup *et al.*, 2007b).

9. Méthodes de détection

Du fait de la pathogénicité de certaines amibes et du risque potentiel que leur présence représente dans les environnements anthropiques, la détection et la recherche des amibes libres a été entreprise dans de nombreuses études. Les méthodes de PCR pour détecter et quantifier les amibes sont en plein développement ces dernières années, les méthodes de culture sur gélose présentant des biais.

9.1. Méthodes de culture

Les amibes des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* sont facilement cultivables sur des géloses non nutritives composées d'agar-agar et recouvertes de bactéries mortes ou vivantes. Le choix des bactéries peut avoir une incidence pour la culture des amibes. Ainsi les bactéries gram négatives, vivantes ou mortes, seraient plus faciles à ingérer par les amibes mais plus difficilement digérées (Pickup *et al.*, 2007a). En général les bactéries choisies pour recouvrir les géloses sont non mucoïdes comme par exemple *Klebsiella penumoniae*, *Enterobacter spp*. ou bien encore *Escherichia coli* (Schuster, 2002). Les bactéries non encapsulées sont préférées car la capsule mucoïde inhibe la phagocytose (Visvesvara *et al.*, 2007). *Hartmannella* prolifère également sur ce type de gélose (Weekers *et al.*, 1993).

Les méthodes de cultures sont utilisées pour la surveillance des concentrations de *N. fowleri* dans les circuits de refroidissement de certaines centrales, pour des études sur leur écologie ou bien encore pour étudier la prévalence d'*Acanthamoeba* spp. dans des réseaux d'eau (Goudot *et al.*, 2012; John and Howard, 1995; Rohr *et al.*, 1998; Stockman *et al.*, 2010). Dans le cas de *N. fowleri*, un test consistant à faire flageller *Naegleria* suivi d'un test immunologique (test ELISA), voir d'un test moléculaire (PCR), est également utilisé pour l'indentification de l'espèce *fowleri* après culture sur gélose. Néanmoins plusieurs biais peuvent être engendrés pas ces méthodes culturales :

- des compétitions entre différentes souches d'amibes peuvent avoir lieu représentant une perte de la diversité de l'échantillon (Pernin *et al.*, 1998)

- la température de mise en culture a également un effet en sélectionnant les amibes thermophiles, ou non, selon la température d'incubation et les amibes ne sont probablement pas toutes cultivables.

La quantification des amibes, en milieu naturel, est possible par méthode de culture grâce à l'utilisation de la méthode NPP (Nombre le Plus Probable). Grâce à l'ensemencement de plusieurs géloses avec un même volume, la méthode permet d'obtenir une estimation statistique de la concentration amibienne de l'échantillon. Cette méthode de dénombrement des amibes dans les échantillons, peut nécessiter une étape de pré-concentration de l'échantillon par filtration ou centrifugation avant la mise en culture. Les étapes préliminaires peuvent induire un biais car une perte d'une partie des amibes est possible. Pernin *et al.* démontrent que pour *N. fowleri* seuls 5% des trophozoites sont récupérés après filtration (Pernin *et al.*, 1998).

9.2.Méthodes de PCR

Afin de palier les inconvénients des méthodes culturales, notamment le délai d'obtention du résultat, des méthodes de PCR ont été développées ces dernières années. Tout comme pour les légionelles, la cible des amorces de PCR est souvent une sous-unité ribosomique. S'agissant là d'eucaryotes, la cible est la sous-unité ribosomique 18S de l'ARN. Des amorces permettant la détection du pathogène *N. fowleri* ont été mises au point par Kilvington et Beeching en 1995. Ces amorces ont été nommées p3f/p3r (Kilvington and Beeching, 1995). Des amorces spécifiques (JDP1/JDP2) au genre *Acanthamoeba* ont été ensuite développées (Schroeder *et al.*, 2001). Des amorces eucaryotes ont également été utilisées comme par exemple EUKf et EUKr mais ces amorces n'étaient pas spécifiques aux amibes (Kuiper *et al.*, 2004). Un autre couple d'amorces permettant l'identification des amibes de façon plus globale, cette fois-ci, est décrit par Thomas *et al.* Il s'agit des amorces ami6F et ami9R (Thomas *et al.*, 2006).

La PCR permet seulement de mettre en évidence la présence d'amibes dans des échantillons et non de les quantifier. C'est pourquoi, l'utilisation de la PCRq qui est une méthode quantitative qui améliore la spécificité, la sensibilité et le temps nécessaire pour la détection de micro-organismes pathogènes (Bej, 2003), est aussi appliquée aux amibes. Rivière *et al.* décrivent, en 2006, un couple d'amorces (TaqAcF1/TaqAcR1) ainsi qu'une sonde (TaqAcP1) pour quantifier les amibes du genre *Acanthamoeba* par PCRq par méthode Taqman (Riviere *et al.*, 2006). Néanmoins, la mise au point d'une PCRq pour l'ensemble des amibes est délicate du fait de l'aspect poly-phylogénétique de ce groupe. Il est difficile de trouver une séquence spécifique sur l'ARN 18S à l'ensemble des amibes libres. LeCalvez et *al.* décrivent la mise au point d'une méthode de détection et de quantification des amibes libres Amoebozoa (*Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Echinamoeba*) et Vahlkampfiidae (*Vahlkampfia* et *Naegleria*) par PCRq multiplexe (Le Calvez *et al.*, 2012). Plus récemment des amorces de PCRq spécifiques aux genres *Acanthamoeba* (AcanF900/AcanF1100) et *Naegleria* (Nae3-For/Nae3-Rev) ont été décrites par Kao *et al.* (Kao *et al.*, 2013a; Kao *et al.*, 2013b). Des amorces spécifiques à *H. vermiformis* (Hv1227F/Hv728R) ont également été mises au point par Kuiper *et al.* (Kuiper *et al.*, 2006).

Une des limites de l'utilisation de ces techniques est la présence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons notamment dans les échantillons environnementaux. Les étapes d'extraction d'ADN sont alors cruciales pour le bon fonctionnement des méthodes de PCR ainsi que l'identification et les quantifications qui en découlent. De plus, la quantification par PCRq ne fait pas le distinguo entre amibe vivante et amibe morte.

RELATION AMIBES-LÉGIONELLES

10. Implication des amibes dans la problématique *Legionella*

10.1. Les amibes, « chevaux de troie »

Certaines amibes libres peuvent s'avérer pathogènes pour l'Homme. En plus de leur pathogénicité propre, la capacité des amibes libres à héberger et permettre la prolifération intracellulaire de bactéries pathogènes conduit à les considérer comme de véritables « chevaux de Troie ». En effet, les bactéries résistantes aux amibes (ARB) peuvent être impliquées dans les infections humaines, telles que la pneumonie (Thomas *et al.*, 2006). Plusieurs types de relations amibes-bactéries sont possibles. Certaines bactéries sont capables de se multiplier alors qu'elles devraient normalement être dégradées par les amibes. C'est le cas de *Legionella* qui cause la lyse des trophozoites alors que d'autres bactéries se multiplient sans entraîner la lyse comme *Vibrio cholera* (Bichai *et al.*, 2008). D'autres ont simplement la capacité de résister à la digestion (survie intracellulaire dans le kyste ou le trophozoite) comme certaines Mycobactéries : *Mycobacterium avium* par exemple (Thomas *et al.*, 2009).

Greub et Raoult dressent une liste, dès 2004, de plusieurs bactéries capables de résister à la phagocytose. Certaines de ces bactéries sont des bactéries intracellulaires obligatoires (*Coxiella burnetii*), d'autres sont des bactéries intracellulaires facultatives (*Listeria monocytogenes*) ou peuvent être des bactéries sans association connue avec des cellules eucaryotes (*Burkholderia capacia* et *Pseudomonas aeruginosa*). Certaines sont des pathogènes humains (*Chlamydophila pneumoniae*) pendant que d'autres sont des pathogènes émergeants (*Simkania negevensis*) voire des bactéries non pathogènes (*Bradyrhizobium japonicum*) (Greub and Raoult, 2004). Depuis 2004, la liste s'est considérablement allongée, Thomas *et al.* fournissent une liste de 102 bactéries pathogènes (*Legionella*, *Mycobacterium, Pseudomonas, Vibrio…*) dont des interactions ont été décrites avec les protozoaires (Thomas *et al.*, 2009). Parmi ces bactéries, 40 ont été isolées en co-culture avec les amibes sans preuve de vie intracellulaire, 30 ont été montrées comme capables de survivre intracellulairement dans les amibes et 32 capables de survivre et proliférer dans les amibes.

Dans l'environnement de nombreuses amibes sont infectées par des bactéries. Pour preuve, selon une étude de Fritsche *et al.*, en 1993, 25% des souches cliniques et environnementales d'*Acanthamoeba* sont infectées par un endosymbionte (Fritsche *et al.*, 1993). Selon Berck *et al.*, ce pourcentage semble être plus important pour les amibes libres isolées dans des circuits de refroidissement de TAR (55%)

que dans l'environnement où seulement 7,5% des amibes seraient infectées par des bactéries (Berk *et al.*, 2006). L'infection de ces amibes par des bactéries, a des conséquences sur leur survie dans l'environnement. La capacité des amibes, notamment des kystes d'*Acanthamoeba*, à résister à des conditions défavorables dans l'environnement (températures élevées, pH ou osmolarité défavorables) suggère leur rôle comme vecteur de bactéries (Khan, 2006).

10.2.Relation amibes-*Legionella*

L'intérêt majeur de la relation entre les amibes libres et les bactéries pathogènes a été accru depuis que Rowbotham, en 1980, a mis en évidence la prolifération de *L. pneumophila* dans les amibes du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria* (Rowbotham, 1980). Il a ainsi suggéré que les vésicules ou que des amibes remplies de légionelles pourraient être des particules susceptibles d'infecter l'Homme et non pas seulement des légionelles sous forme libre. Quelques années plus tard, Fields *et al.* ont mis en évidence la capacité des légionelles à proliférer dans les amibes du genre *Hartmannella* (Fields *et al.*, 1989). Depuis lors, la multiplication de *L. pneumophila* dans de nombreuses espèces de protozoaires a été décrite, et cette intéraction hôte-pathogène est au cœur de la pathogénicité et de l'écologie de *L. pneumophila* (Abu Kwaik *et al.,* 1998). Néanmoins, selon Buse *et al.*, il semblerait que les conditions environnementales notamment la température et l'espèce d'amibes hôtes influent fortement sur la multiplication des souches pathogènes de *Legionella* (Buse and Ashbolt, 2011).

La multiplication des légionelles dans les amibes, notamment dans les amibes du genre *Acanthameoba*, genre le plus étudié, est décrite dans la littérature par de nombreux auteurs (Fields *et al.*, 1989; Rowbotham, 1986). Le Tableau 2, tiré de l'article de Lau et Ashbolt de 2009, présente les différentes amibes et ciliés pour lesquels la multiplication de *Legionella* a été mise en évidence. Les genres amibiens étudiés sont restreints, les études ont principalement été réalisées avec des souches appartenant aux genres *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella*, genres avec lesquels notre étude a été réalisée.

Récemment d'autres auteurs ont révélé la multiplication de *Legionella* à l'intérieur du tractus intestinal du métazoaire *Caenorhadbitis* (Brassinga *et al.*, 2010). Dans ce cas, *Legionella* est capable de survivre et de se multiplier dans ce tractus sans pour autant coloniser d'autres tissus du ver, puis est ensuite rejetée dans le milieu extérieur.

Tableau 2 : Espèces de protozoaires décrites comme permettant la multiplication intracellulaire de *Legionella spp.* (Lau and Ashbolt, 2009)

Amibes	**Références**
Acanthamoeba castellani	Rowbotham (1980)
Acanthamoeba hatchetti	Breiman et al. (1990b)
Acanthamoeba palestinensis	Rowbotham (1986)
Acanthamoeba culbertsoni	Fields et al. (1989)
Acanthamoeba polyphaga	Rowbotham (1980, 1986)
Acanthamoeba royreba	Tyndall and Domingue (1982)
Amoeba proteus strain x D	Park et al. (2004)
Comandonia operculata	Breiman et al. (1990b)
Echinamoeba exudans	Fields et al. (1989)
Filamoeba nolandi	Breiman et al. (1990b)
Hartmannella spp.	Fields et al. (1989)
Hartmannella cantabrigiensis	Rowbotham (1986); Breiman et al. (1990b)
Hartmannella vermiformis	Fields et al. (1989); Breiman et al. (1990b)
Naegleri fowleri	Newsome et al. (1985)
Naegleri gruberi	Rowbotham (1980)
Naegleri jadini	Rowbotham (1980)
Naegleri lovaniensis	Tyndall and Domingue (1982)
Paratetramitus jugosis	Breiman et al. (1990b)
Vahlkampfia spp.	Breiman et al. (1990b)
Vahlkampfia jugosa	Rowbotham (1986)
Vahlkampfia ustiana	Breiman et al. (1990b)
Dictyostelium discoideum	Hagele et al. (2000)
Ciliés	**Références**
Tetrahymena pyriformis	Fields et al. (1984)
Tetrahymena thermophila	Kikuhara et al. (1994)

La multiplication dans les amibes semble plus ou moins importante selon le genre amibien infecté. Ainsi selon Dey *et al.*, les genres *Acanthamoeba* et *Hartmanella* permettent une multiplication plus importante de légionelles que le genre *Willaertia* (Dey *et al.*, 2009). Par ailleurs, une des souches de *Willaertia*, la souche nommée c2c inhibe même la croissance de *L. pneumophila* Paris mais pas celle des souches Lens et Philadelphia. Cela montre qu'il existe également des variations de comportement en fonction de la souche de *L. pneumophila* infectant les amibes. Ces auteurs rappellent que *Willaertia* appartient à la famille des *Vahlkampfidae* tout comme *Naegleria*. Cette amibe est décrite par Declerck *et al.*, comme permettant une moindre multiplication de *L. pneumophila* que les amibes du genre

Acanthamoeba. Selon leur étude *A. castellanii* permet une multiplication 3 fois plus importante de *L. pneumophila* que *N. lovaniensis* dans les mêmes conditions de culture (Declerck *et al.*, 2005). D'après Chang *et al.*, *A. castellani* permet une infection et une réplication plus efficace de *L. pneumophila* que *H. vermiformis* (Chang *et al.*, 2009).

Le sérogroupe peut également avoir un impact sur la capacité des souches de *L. pneumophila* à infecter une même amibe, en l'occurrence *A. polyphaga* (Messi *et al.*, 2013). Dans cette études, les *L. pneumophila* de sérogroupe 1 et de sérogroupe 6 ont montré une bonne capacité de réplication (augmentation de population d'environ 2 log aprés 72 heures et 1 log après 72 heures, respectivement, en co-culture à 30°C) alors que pour celle du sérogroupe 9 la multiplication s'est avérée faible dans les mêmes conditions (Messi *et al.*, 2013). D'après ces auteurs, le fait d'utiliser des souches peu ou pas virulentes a peut être eu un effet sur leur prolifération dans les amibes, ces souches seraient peut-être moins aptes à se multiplier dans les amibes. D'autres auteurs, Tyndall et Domingue ont constaté des faits similaires à savoir la destruction de 99% d'une souche de *L. pneumophila* peu virulente après 24h de co-culture avec *N. lovaniensis* (Tyndall and Domingue, 1982).

De façon plus générale, le « couple » amibe hôte et souche de *Legionella* semble être important. D'après Buse et Ashbolt certaines souches de *Legionella* ne sont pas capables de proliférer dans tous les genres amibiens (Buse *et al.*, 2011). En conclusion, au vu de la littérature (Chang *et al.*, 2009; Declerck *et al.*, 2005), le genre *Acanthamoeba* serait le genre amibien qui permettrait la multiplication en plus grande quantité des légionelles, mais il convient de noter que ce genre *Acanthamoeba* est également le plus étudié.

11. Cycle de multiplication, aspects moléculaires et facteurs d'influence

Dans cette partie, le cycle de multiplication ainsi que les régulations génétiques associées vont être présentés en trois parties :

1 l'attachement de *L. pneumophila* à la cellule amibienne et sa pénétration.
2 l'internalisation et la multiplication de *L. pneumophila*
3 la prolifération de *L. pneumophila* et sa sortie de la cellule hôte

Le cycle complet de la réplication, Figure 10, sera présenté après ces trois parties afin de représenter visuellement les principaux éléments préalablement décrits. Il sera suivi d'une partie s'intéressant aux conséquences phénotypiques du passage des légionelles dans les amibes. Le descriptif des facteurs pouvant influer sur la prolifération de *Legionella* dans les amibes viendra clore l'ensemble des descriptions du cycle.

11.1.Attachement et mécanismes de pénétration dans les amibes

L. pneumophila et les amibes sont présentes dans les mêmes niches écologiques : environnements aquatiques, biofilms. Dans ces niches, les amibes se nourrissent en consommant les bactéries présentes dans le biofilm où *L. pneumophila* peut être rencontrée. Les trophozoites sont alors susceptibles de phagocyter ces bactéries. Néanmoins, il apparaît que *L. pneumophila* dispose de mécanismes spécifiques lui permettant d'infecter les amibes. Un pili de type IV désigné CAP (*Competence and Adherence-associated Pili*) est impliqué dans l'attachement aux protozoaires (Stone and Abu Kwaik, 1998). Ce pili favoriserait une meilleure survie de la bactérie dans l'environnement en augmentant l'adhésion au biofilm et aux cellules hôtes protozoaires. Le gène *mip* est également impliqué dans l'infection des amibes, notamment dans la capacité des légionelles à se lier aux cellules (Cianciotto and Fields, 1992). Ce gène code une protéine de surface de liaison, FK506, qui a une activité cis-trans-isomérase pepdylproline (PPIase). Cette protéine est requise pour une infection optimale de la cellule hôte. Debroy et *al.* ont mis en évidence une cible pour *mip* et la probable implication d'une PPIase de surface dans la sécrétion ou l'activité de protéines au-delà de la membrane externe (Debroy *et al.*, 2006). Le gène *mip* serait donc impliqué dans la sécrétion d'effecteurs favorisant l'infection des cellules hôtes.

Des mécanismes basés sur la reconnaissance de *L. pneumophila* par des récepteurs présents chez les amibes sont décrits dans la littérature. Venkataraman et *al.* sont les premiers à décrire chez *H. vermiformis* l'implication d'un récepteur spécifique, de 170 kDa, et caractérisé comme une lectine Gal/Gal-Nac (Galactose/N-AcetylGalactosamine) (Venkataraman *et al.*, 1997). Les lectines sont des protéines impliquées dans la reconnaissance cellulaire qui se lient de façon réversible à certains glucides. L'activation de ce récepteur entraîne la déphosphorylation d'une tyrosine ainsi que la synthèse de novo, de plusieurs protéines, chez l'hôte, essentielles pour l'absorption de la bactérie (Declerck *et al.*, 2007). La poursuite des investigations de Vankatamam *et al.* aboutit l'année suivante à un modèle décrivant l'invasion de *H. vermiformis* par *L. pneumophila*. L'adhésion de la bactérie au récepteur lectine Gal/Gal-Nac est associée à l'induction d'une activité tyrosine phosphatase qui permet la déphosphorylation de la lectine et de certaines protéines du cytosquelette. Ces auteurs émettent l'hypothèse que ces activations se manifestent par une perturbation du cytosquelette évitant le rejet de la bactérie. Ces perturbations seraient associées à des mécanismes d'activation de l'endocytose qui se mettraient en place après internalisation de *L. pneumophila*. Selon Kwaik *et al.*, l'attachement de la bactérie et l'invasion de la cellule hôte *H. vermiformis* sont également associés à l'induction de gènes spécifiques chez l'amibe permettant ensuite la survie et la multiplication au sein de cette amibe (Abu Kwaik *et al.*, 1994). Chez *H. vermiformis*, le mécanisme d'infection via les récepteurs médiant l'endocytose par *Legionella* est, d'après Venkataram *et al*., le moyen d'entrée prédominant de la

bactérie dans cette amibe (93%). La phagocytose ne représenterait que 7% des internalisations de la bactérie (Venkataraman *et al.*, 1998).

Harb *et al.* décrivent un mécanisme différent chez *A. polyphaga*. La protéine de *L. pneumophila* se liant au récepteur Gal/Gal-Nac ne serait pas nécessaire à l'infection de ces amibes. Les mécanismes de déphosphorylation induits par l'activation du récepteur semblent moins prononcés chez *A. polyphaga*. Néanmoins cette amibe possèderait un autre récepteur ou un récepteur similaire mais avec une plus faible affinité pour *L. pneumophila* (Harb *et al.*, 1998). Les observations de ces auteurs confirment celles de Kwaik *et al*. de 1994 : les mécanismes d'invasion de *L. pneumophila* sont différents de ceux utilisés par les autres pathogènes intracellulaires.

Quelques années plus tard, Declerck *et al.*, ont montré la grande affinité de *L. pneumophila* pour un domaine α1-3D-mannose d'un récepteur à mannose présent chez *A. castellanii*. Chez *N. lovaniensis*, la bactérie présente une haute affinité pour le domaine GalNAcβ1-4 Gal du récepteur lectine N-acétylgalactosamine (Declerck *et al.*, 2007). L'attachement de *L. pneumophila* aux amibes est réalisé par des interactions entre des oligosaccharides de la bactérie et les récepteurs des amibes. Ces données montrent la remarquable adaptation de *L. pneumophila* à se fixer et à envahir différents hôtes amibiens via des récepteurs différents selon les espèces d'amibes et aboutissant tous à une multiplication intracellulaire qui elle, fait appel à des mécanismes similaires.

11.2.Internalisation et dérivation de la voie d'endocytose

Après l'interaction initiale entre l'amibe et *Legionella*, la bactérie est internalisée. Dès les premières minutes de l'internalisation, le phagosome contenant la bactérie aussi appelé LCV (*Legionella Containing Vacuole*) est couverte de petites vésicules lisses provenant probablement du RER (Reticulum Endoplasmique) (Swanson and Isberg, 1995). D'autres organites cellulaires comme des mitochondries ou des ribosomes sont également recrutés à proximité du LCV. Ce changement de structure membranaire, membrane multicouche dérivée du RER, intervient de façon concomitante avec l'évasion réussie de la voie d'endocytose ; la fusion phagosome-lysosome est bloquée (Bozue and Johnson, 1996). La LCV en plus de la protection qu'elle offre aux légionelles vis-a-vis du système immunitaire permet de fournir aux bactéries les nutriments nécessaires pour leur multiplication (Xu and Luo, 2012). Kwaik *et al.* suggèrent un délai de 4 heures avant l'initiation de la réplication intracellulaire. Ce temps correspond au délai pour recruter les organites de la cellule hôte nécessaires pour la réplication (Abu Kwaik *et al.*, 1998).

La capacité de *L. pneumophila* à maitriser les mécanismes de la phagocytose est grandement dépendante du système de sécrétion de type IV Dot/icm. Ce système de sécrétion est un système de

sécrétion ancestral qui permet le transfert d'ADN entre les bactéries lors du phénomène de conjugaison (Christie *et al.*, 2005). *Legionella* utilise ce transporteur pour transférer des macromolécules et des protéines effectrices (qui modulent des fonctions chez l'hôte) dans la cellule hôte, via la formation de pores, et ainsi s'évader de la voie d'endocytose (Molmeret *et al.*, 2005). Environ 300 protéines effectrices, représentant environ 10% de la capacité d'encodage du génome de *Legionella*, sont introduites par ce système. De plus, parmi ces protéines effectrices, plusieurs présentent des domaines de type eucaryote comme des motifs de répétitions riches en leucine (Richards *et al.*, 2013).

Un système de sécrétion de type II est également utilisé par la bactérie pour sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire et/ou dans les cellules hôtes (Cianciotto, 2009). Ce système pourrait permettre la sécrétion de plus de 35 protéines et serait également impliqué dans l'écologie de la bactérie en permettant la croissance extracellulaire à des températures basses. Les protéines secrétées par ce système contribuent de manière différente à l'infection d'une large gamme d'hôte par *Legionella* (Tyson *et al.*, 2013). Par exemple, la ribonucléase SrnA, l'acyltransférase PlaC, et la metallo-protéase ProA sont requises pour une multiplication intracellulaire optimale chez *H. vermiformis* mais pas chez *A. castellanii* (Rossier *et al.*, 2009; Tyson *et al.*, 2013).

La déviation de la voie de phagocytose est un mécanisme complexe médié par de nombreuses protéines effectrices sécrétées principalement par un système de sécrétion de type IV mais également par un système de sécrétion de type II. Le rôle de ces protéines est d'engendrer des modifications permettant à la bactérie de transformer le phagosome en vésicule réplicative via le recrutement d'organelles cellulaires et d'éléments provenant du RER.

11.3.Prolifération et sortie des amibes

A la suite de la déviation de la LCV et de la déviation de la voie de phagocytose, *Legionella* se met à proliférer dans la vacuole réplicative. La bactérie entre alors en phase exponentielle de croissance et exprime les mêmes caractères que lors de la phase exponentielle en milieu de culture artificiel (Molofsky and Swanson, 2004). La transition entre la phase exponentielle et la phase tramsmissive est gouvernée par de nombreux facteurs qui sont influencés par le niveau de nutriments intracellulaires. L'alarmone qu'est ppGpp est le régulateur principal de nombreux gènes qui déclenchent des modulations phénotypiques lors du passage de la phase exponentielle à la phase transmissive (Swanson and Hammer, 2000; Richards *et al.*, 2013). Le cycle de vie biphasique de *Legionella*, précédemment décrit dans le chapitre *Legionella* est retrouvé ici.

Une fois la réplication terminée, la membrane du phagosome est rompue grâce à un « pore de sortie », les légionelles se retrouvent alors dans le cytoplasme (Molmeret *et al.*, 2004). Des mécanismes liés à l'apoptose dont *Legionella* contrôle l'équilibre chez la cellule hôte sont ensuite mis en place. Le contrôle de ce processus est essentiel pour *Legionella*, qui dans un premier temps bloque ce mécanisme d'apoptose ce qui lui permet de se répliquer dans la cellule hôte, puis inversement à la fin de cette phase de multiplication : la bactérie induit l'apoptose de la cellule hôte (Luo, 2011). Chez les cellules de mammifères, *Legionella* induit l'apoptose par l'activation de caspases notamment la caspase 3, qui est impliquée dans la voie classique de l'apoptose chez ces cellules (Gao and Abu Kwaik, 1999; Luo, 2011). Chez les amibes, le mécanisme de signalisation de l'apoptose entraînant la lyse cellulaire et ainsi la libération de *Legionella* n'est pas documenté.

Une fois la prolifération terminée, *Legionella* peut être libérée sous différentes formes après le passage dans les amibes, Figure 10 :

- soit libre après avoir entraîné la lyse de la cellule hôte
- soit dans des vésicules intactes contenant des centaines de bactéries

La taille des vésicules est généralement de 1 à 5 µm et sont donc considérées comme respirables. Elles peuvent contenir plusieurs centaines de bactéries et sont, à ce titre, considérées comme une source potentielle d'infection pour l'Homme (Berk *et al.*, 1998).

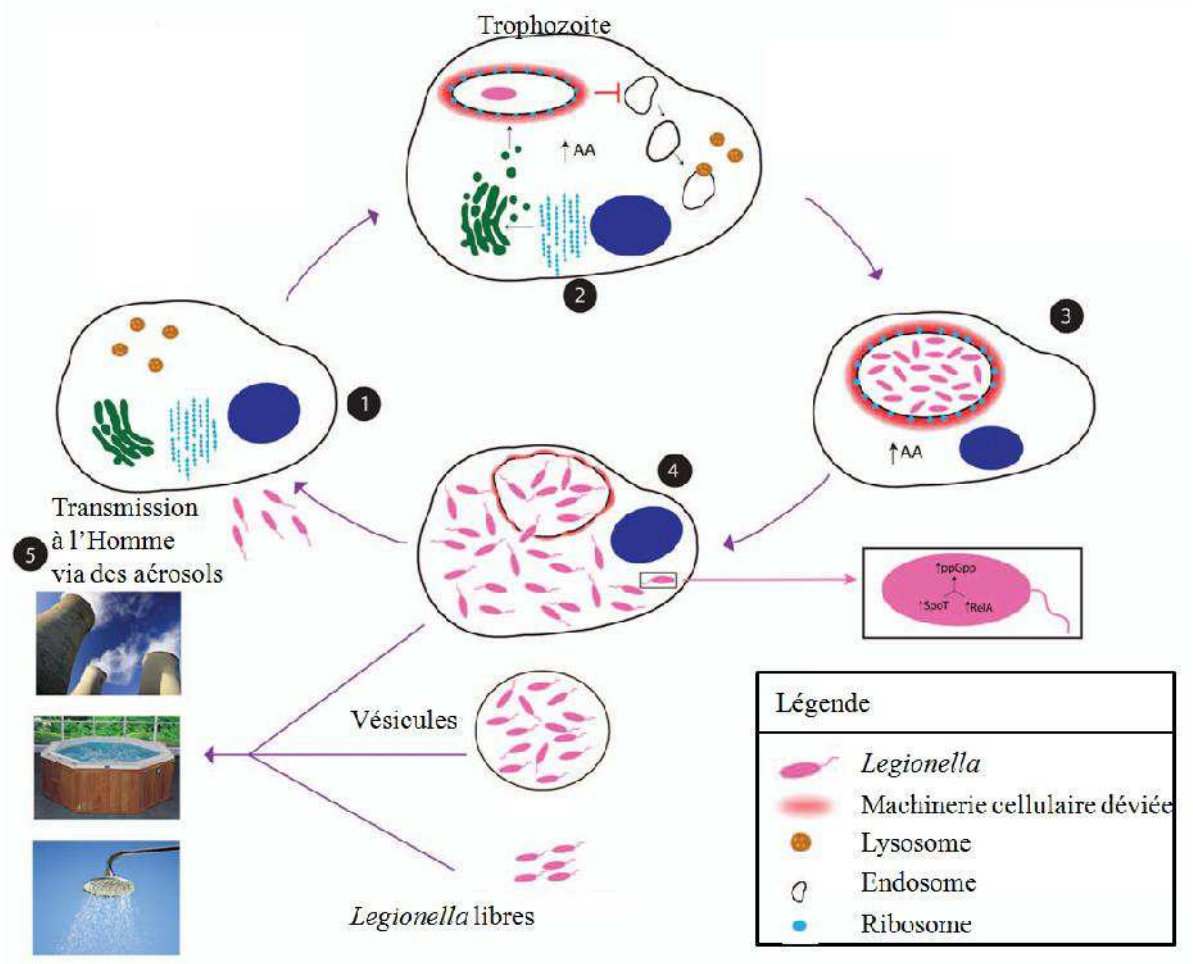


Figure 10 : Cycle de vie de *Legionella* dans les trophozoites d'après Richards *et al.*, 2013

1 *Legionella* infecte l'amibe, le flagelle et des signaux de reconnaissances membranaires favorisent l'adhésion de la bactérie

2 La LCV élude la voie de dégradation endosome-lysosome, la membrane du LCV est modifiée grâce à l'interception de vésicules en provenance de l'appareil de Golgi

3 *Legionella* se multiplie au sein de la vacuole réplicative, les niveaux d'acides aminés (AA) sont élevés, favorisant la prolifération bactérienne

4 L'augmentation du niveau de ppGpp déclenche la transition phénotypique vers la forme transmissive. La membrane du LCV est perturbée, les bactéries deviennent cytoplasmiques puis entraînent la lyse de la cellule hôte ce qui libère *Legionella* dans l'environnement. Des vésicules intactes peuvent également être excrétées.

5 La bactérie se transmet à l'Homme via des aérosols générés par les installations humaines telles que les douches, les spas ou les TAR.

11.4.Conséquences du passage des légionelles dans les amibes

A la sortie des amibes, *Legionella* exprime les caractères de la phase transmissive. Dans le chapitre *Legionella*, une présentation des caractéristiques de ces bactéries en phase réplicative a déjà été faite avec notamment une augmentation de la résistance et de la virulence de ces bactéries. Mais il semblerait qu'après passage dans les amibes, *Legionella* acquiert des caractères de résistance et de virulence plus importants qu'après une simple multiplication en dehors d'un hôte. D'après Cirillo *et al.*, les légionelles sorties de l'amibe *A. castellanii* après multiplication ont un potentiel d'infection augmenté (entrée et réplication dans les cellules hôtes) par rapport à des bactéries simplement cultivées sur milieu de culture gélosé (Cirillo *et al.*, 1994; Cirillo *et al.*, 1999). Une augmentation de la résistance aux antibiotiques peut également être engendrée par le passage dans les amibes. Lors d'une étude menée par Barker *et al.*, ces auteurs ont pu constater une augmentation de la résistance de *L. pneumophila* à trois antibiotiques : la rifampine, l'érythromycine et la ciprofloxacine et ce jusqu'à un facteur 1000 dans le cas de la rifampine (Barker *et al.*, 1995). Ce phénotype est néanmoins réversible. Une culture en milieu liquide de 48 heures permet de retrouver le phénotype caractéristique d'une culture in vitro. Ces mêmes auteurs soulignent quelques années plus tôt que la sensibilité aux traitements chimiques peut être également réduite après passage dans les amibes. Lors de leur étude, ils ont testés trois biocides : le polyhéxaméthylene biguanide (biocide non oxydant), le benzisothiazolone (conservateur présentant une activité biocide) et le 5-chloro-N-méthylisothiazolone (conservateur présentant une activité biocide). Pour ces trois biocides, leur activité a été réduite sur les *L. pneumophila* qui se sont préalablement multipliées dans les amibes (Barker *et al.*, 1992). L'action des biocides oxydants sur *Legionella* sera détaillée dans le dernier chapitre portant sur la désinfection.

Le passage de *L. pneumophila* dans les amibes permet également de « réactiver » ces bactéries lorsqu'elles sont dans l'état VBNC. Après une longue période en milieu carencé (Steinert *et al.*, 2007), ou après un traitement chimique (Garcia *et al.*, 2008), le passage des bactéries en état VBNC, dans les amibes permet de les cultiver de nouveau sur milieu gélosé. Ce passage dans les amibes promeut aussi d'autres types de modulations phénotypiques comme par exemple l'apparition de légionelles sous forme MIF (*Mature Intracellular Form*). Cette forme possède une morphologie de type kyste (forme arrondie et trapue, très nombreux grains de poly-β-hydroxybutyrate) (Garduno *et al.*, 2002). Elle est métaboliquement proche de la dormance, plus infectieuse et résistante aux détergents et aux antibiotiques. Il est possible que cette forme contribue à l'écologie de *Legionella* lorsque les nutriments viennent à manquer dans les environnements hydriques et que les hôtes amibiens sont enkystés (Richards *et al.*, 2013).

11.5.Paramètres influençant la prolifération de *Legionella*

La multiplication de *Legionella* dans les amibes peut être influencée par différents paramètres outre l'hôte amibien infecté, et, peut-être aussi la souche de *Legionella* comme précédemment évoqué paragraphe amibe-*Legionella*.

La température est le facteur influençant la multiplication de *Legionella* au sein des amibes le plus décrit dans la littérature. Rowbotham souligne qu'une température de 30-35°C semble optimale pour la prolifération de la bactérie. A 21°C, il a constaté qu'il était plus difficile d'infecter les amibes (Rowbotham, 1980). Ohno *et al.* rapportent qu'à des températures basses (inférieures à 20°C), *A. castellanii* semble éliminer *L. pneumophila* par digestion et enkystement. L'activation de *csrA* qui promeut l'activation de facteurs de réplication chez *Legionella* n'aurait lieu que pour des températures supérieures à 25°C (Ohno *et al.*, 2008). L'importance du facteur température est soulignée également par Buse et Ashbolt. Lors de leur étude, ils ont pu constater à 24°C l'absence ou la faible multiplication de souches de *L. pneumophila*, au sein d'amibes de 3 genres (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*) par rapport à des températures plus élevées qui elles, ont permis plus facilement la prolifération de ces légionelles (Buse and Ashbolt, 2011).

Ohno *et al.* suggèrent que la MOI (*Multiplicity Of Infection*), qui correspond au ratio des concentrations en bactéries sur les concentrations en amibes a également un rôle. L'enkystement des amibes serait stimulé en partie par l'infection par *L. pneumophila* via la surexpression d'une métacaspase de type 1 (Ohno *et al.*, 2008). D'autres auteurs, indiquent que l'enkystement serait, potentiellement, la principale réponse physiologique mise en œuvre par les amibes pour échapper à l'infection par les légionelles (Greub and Raoult, 2003). Des MOI trop élevées pourraient donc entraîner un enkystement des amibes.

La présence d'autres bactéries peut aussi influencer la prolifération de *Legionella* dans les amibes. Dans une étude récente, Garcia *et al*. ont détecté la présence de *L. pneumophila* intra-amibienne dans 13,9% de leur isolats mais également de *Pseudomonas* spp. et de *Mycobacterium* spp. (Garcia *et al.*, 2013). Bien qu'ils n'aient pas mis en évidence de relation entre la présence de ces bactéries et *L. pneumophila*, leur étude montre que *Legionella* n'est pas la seule bactérie présente dans les amibes. D'après Declerck *et al.*, la présence de *P. aeruginosa* pourrait avoir une influence négative sur la réplication de *L. pneumophila* car cette bactérie consommerait des nutriments en provenance de l'amibe, nécessaires à *L. pneumophila* lors de sa réplication (Declerck *et al.*, 2005). De plus, lors de son passage intracellulaire *Legionella* serait capable d'échanges de gènes avec des bactéries présentes simultanément dans les amibes comme par exemple des *Chlamydiales* (Gimenez *et al.*, 2011). Cet

échange pourrait jouer un rôle important dans la sélection de bactéries capables de résister à la phagocytose.

La température est le paramètre qui est le plus souvent décrit dans la littérature mais peu de travaux étudient spécifiquement l'effet de ce paramètre. Chaque auteur s'applique à décrire les conditions précises pour lesquelles les tests de prolifération sont effectués mais les facteurs d'influence sont à l'heure actuelle peu étudiés.

12. Différents types d'association légionelles/amibes

Dans la partie précédente nous avons vu que *Legionella* peut être libérée, après passage au sein des amibes, soit dans des vésicules, soit sous forme libre. Par ailleurs, le bacille peut logiquement être retrouvé dans la forme trophozoite de l'amibe puisque c'est cette forme qui permet sa multiplication, la présence de *Legionella* dans les amibes sous forme trophozoite est avérée depuis de nombreuses années et par de nombreux auteurs. Par contre, la présence de *Legionella* dans les kystes est sujette à discussion. Dans cette partie, la présence de *Legionella* dans les kystes va être discutée ainsi que la présence dans les vésicules, vésicules qui peuvent contenir plusieurs centaines de bactéries.

12.1. Présence de *Legionella* dans les kystes amibiens

La présence de *Legionella* dans les kystes a été mise en évidence grâce à la microscopie électronique dans 2 études. La première étude montrant ce phénomène a été réalisée en 1983, et présente un kyste d'*A. palestinensis* rempli de légionelles, Figure 11 (Skinner *et al.*, 1983). La seconde étude a été réalisée quelques années plus tard, et met en lumière la survie de *L. pneumophila* à l'intérieur de kystes d'*A. polyphaga* immatures et matures (Kilvington and Price, 1990). Plus récemment, Declerck *et al*. indiquent en 2005 avoir détecté *L. pneumophila* dans des kystes de *N. lovaniensis* mais pas dans des kystes *d'A.castellanii* (Declerck *et al.*, 2005). Quelques années plus tard ces mêmes auteurs décrivent brièvement un protocole permettant d'obtenir des kystes d'*A. castellanii* infectés par *L. pneumophila* (Declerck *et al.*, 2010). Une induction rapide de l'enkystement après l'infection des trophozoites par *Legionella* permettrait l'obtention de ces kystes infectés (Declerck *et al*., 2005).

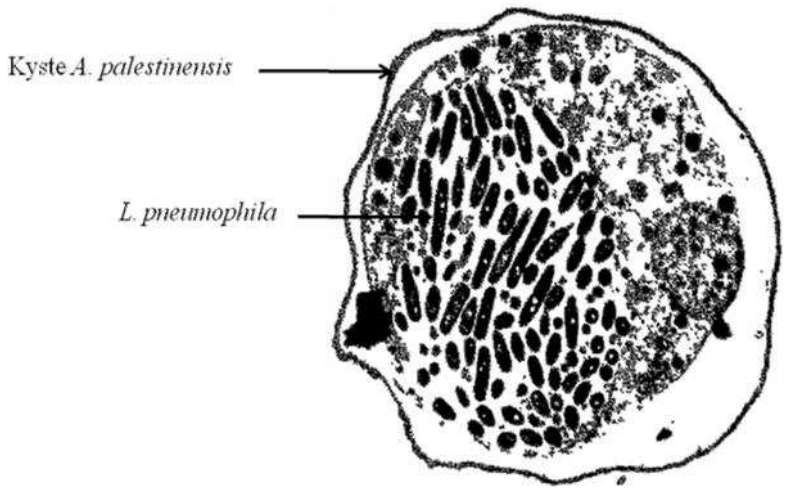


Figure 11 : *L. pneumophila* appartenant au sérogroupe 1 agrégées dans un kyste d'*A. palestinensis* (Skinner *et al.*, 1983)

Outre *Legionella* d'autres bactéries ont également été observées dans des kystes amibiens. Steinert *et al.* ont reporté en 1998, la présence de *Mycobacterium avium* dans la double paroi de kystes d'*A. polyphaga* (Steinert *et al.*, 1998). La bactérie *Sinkania negevensis*, responsable de maladies respiratoires chez les personnes immunodéprimées, a aussi été retrouvée dans des kystes d'*A. polyphaga* (Kahane *et al.*, 2001). Les auteurs de cette étude ont remarqué une augmentation du pouvoir pathogène des bactéries qui ont été séquestrées dans des kystes.

D'autres études menées sur *Legionella* n'ont pas mis en évidence la présence de cette bactérie dans les kystes. Par exemple, Greub et Raoult, malgré l'observation d'une centaine de kystes d'*H. vermiformis* en microscopie électronique n'ont pas réussi à observer de légionelles dans les kystes, par contre ils ont noté la présence de *L. pneumophila* dans des vacuoles d'une amibe en cours d'enkystement et d'autres enchâssées entre les deux parois d'un kyste (Greub and Raoult, 2003). Une autre étude menée sur la survie de *L. pneumophila* après passage dans l'amibe *A. castellanii* n'a pas non plus permis de visualiser *L. pneumophila* dans des kystes (Bouyer *et al.*, 2007). Pourtant la survie de *Legionella* dans les kystes pourrait avoir un impact important sur l'écologie de *Legionella* puisque, comme nous le verrons par la suite, les kystes peuvent être beaucoup plus résistants que les trophozoites aux biocides utilisés comme désinfectant dans les TAR. Plusieurs auteurs, (Fallon and Rowbotham, 1990; Thomas *et al.*, 2004) soulignent le fait que les kystes pourraient représenter une protection efficace pour les légionelles dans l'environnement et ainsi leur permettre un maintien dans des environnements défavorables notamment lors des traitements chimiques. D'autres auteurs considèrent au contraire que la présence de vésicules juste avant l'enkystement est la preuve que les amibes expulsent ces vésicules contenant *Legionella* plutôt que de les conserver dans les kystes (Ohno *et al.*, 2008). Pour ces auteurs, les kystes ne contreindraient pas de *Legionella* et n'auraient donc pas de rôle de protection de *Legionella* dans l'environnement.

Par ailleurs, il convient de noter que très récemment Buse *et al.*, ont observé l'induction de l'état VBNC de la souche *L. pneumophila* Philadelphia, en 72 heures, lors de sa mise en contact avec du surnageant du milieu d'enkystement d'une souche d'*Hartmannella* (Buse *et al.*, 2013). D'après ces auteurs, *H. vermiformis* pourrait sécréter des facteurs lors de la phase d'enkystement qui promeuvent la préservation de l'amibe et inhibe la croissance de *L. pneumophila* permettant ainsi d'augmenter les chances de survie de l'amibe.

12.2.Présence de *Legionella* dans les vésicules

Legionella a également été mise en évidence à l'intérieur de vésicules. Ces vésicules se forment lors de l'enkystement, l'amibe les expulse lors du processus d'enkystement (Bouyer *et al.*, 2007; Greub and Raoult, 2003), les légionelles se retrouvent alors piégées à l'intérieur. L'expulsion de ces vésicules est réalisée par exocytose dès le début de l'enkystement (Stewart and Weisman, 1972). Les vésicules ont une taille de 2 à 5 µm, taille considérée comme respirable, et peuvent contenir des centaines de bactéries. Ces vésicules sont un mode de transmission potentiel des légionelles dans les TAR (Berk *et al.*, 1998). Ces auteurs indiquent qu'une forte MOI entraîne une production de vésicules importante : une MOI de 10 000 induit la production en 24 heures de plus 25 vésicules par amibe chez *A. polyphaga*. Ils démontrent également la résistance physique de ces vésicules puisqu'après trois traitements thermiques par le froid (-70°C), leur morphologie n'est pas affectée alors qu'avec des traitements identiques, des trophozoites sont complètement détruits. Les légionelles à l'intérieur de ces vésicules s'agrègent et ne se dispersent pas malgré des traitements thermiques (-70°C et 35°C) et des traitements aux ultrasons (Bichai *et al.*, 2008). Ces vésicules permettent également une survie à long terme des légionelles. Bouyer et *al.* décrivent un temps de survie de plus de 6 mois à l'intérieur de vésicules issues d'*A. castellanii* après co-culture alors que des *Legionella* seules dans le milieu d'enkystement n'apparaissent plus cultivables dès 15 jours (Bouyer *et al.*, 2007).

Au final, il semblerait que dans l'environnement, *Legionella* pourrait être retrouvée :

- soit sous forme libre, sans lien avec les amibes,
- soit associée avec les amibes dans les trophozoites et éventuellement dans les kystes
- soit dans des vésicules sécrétées lors de l'enkystement

Ces différents types d'association ont des conséquences sur la virulence, la survie et la dissémination dans l'environnement de *Legionella*.

TRAITEMENTS CHIMIQUES

13. Réglementation *Legionella*

13.1.Réglementation des ICPE

Afin d'éviter les proliférations des populations de *Legionella*, dans les TAR des ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement) et de limiter les risques sanitaires associés, une réglementation (arrêté du 13 Décembre 2004 rubrique 2921) relative aux systèmes de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air a été mise en place. Cette rubrique est actuellement en cours de révision.

Il existe plusieurs modes de fonctionnement pour ce type de tours, les Figure 12 et 13 en présentent deux :

- Un type ouvert où l'eau à refroidir est directement pulvérisée dans le flux d'air (Figure 12)
- Un type fermé où l'eau à refroidir passe dans un échangeur thermique, le refroidissement du circuit est assuré par évaporation d'eau projetée sur le circuit d'échange (Figure 13)

Dans les deux modes de fonctionnement, le flux d'air peut entraîner des gouttelettes à l'extérieur du système malgré la présence d'un pare-gouttelettes. *Legionella* est alors dispersée dans l'environnement.

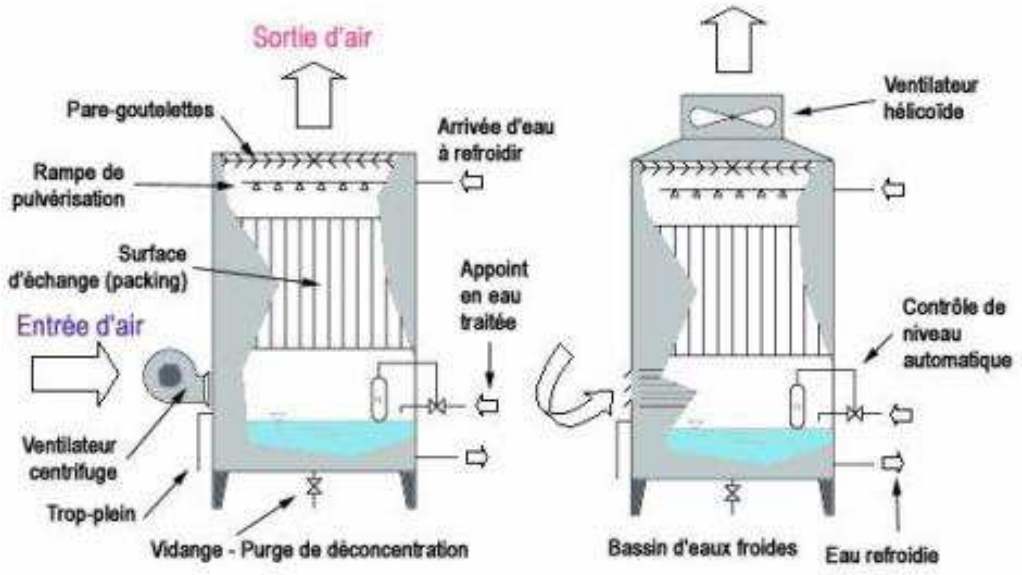


Figure 12 : Schéma d'une TAR type ouvert (http://www.installationsclassees.developpement-durable.gouv.fr/5-Tours-aerorefrigerantes.html)

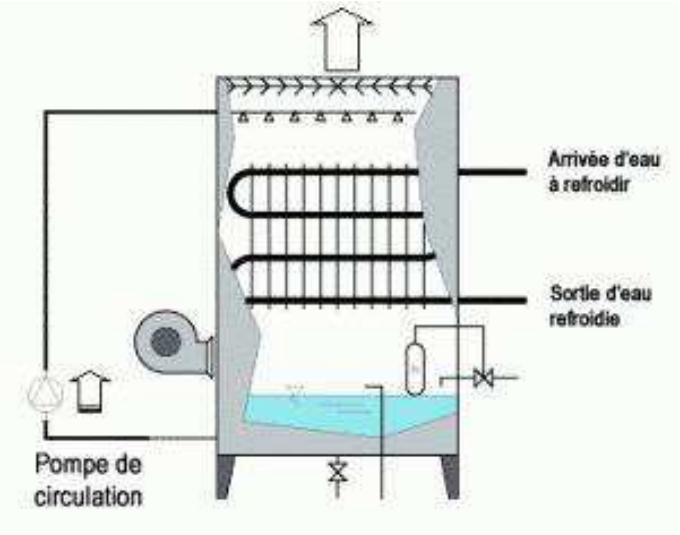


Figure 13 : Schéma d'une TAR type fermé (http://www.installationsclassees.developpement-durable.gouv.fr/5-Tours-aerorefrigerantes.html)

La législation prévoit de réaliser le suivi des concentrations en *Legionella*, dans ce type d'installation, selon la norme NT 90-431 et fixe différents seuils d'action :

- Un plan d'entretien préventif, de nettoyage et désinfection de l'installation, visant à maintenir en permanence la concentration en légionelles dans l'eau du circuit à un niveau inférieur à 10^3 UFC/Litre. Au-delà de ce taux, les prélèvements trimestriels deviennent bi-mensuels et des actions supplémentaires sont à mener pour abaisser la concentration.
- Au-delà de 10^5 UFC/Litre, l'installation doit être arrêtée dans les meilleurs délais puis vidangée, nettoyée et désinfectée. Après redémarrage, des prélèvements tous les 15 jours doivent être effectués pendant 3 mois.

13.2.Cas spécifiques des centrales électriques

De part leur mode de fonctionnement, certaines centrales électriques disposent de CRF (Circuits de ReFroidissement) semi-fermés équipés de TAR, Figure 14. Ces CRF sont alimentés en eau brute (de rivière). Cette eau est réchauffée lors du passage dans les condenseurs (un condenseur tubulaire) et, est ensuite refroidie dans la TAR où elle est dispersée sous forme de pluie sur le corps d'échange de l'aéro-réfrigérant. Une partie de cette eau peut être entraînée par le flux d'air dans le panache. Les *Legionella* qui se sont développées dans le circuit peuvent ainsi être dispersées dans l'environnement.

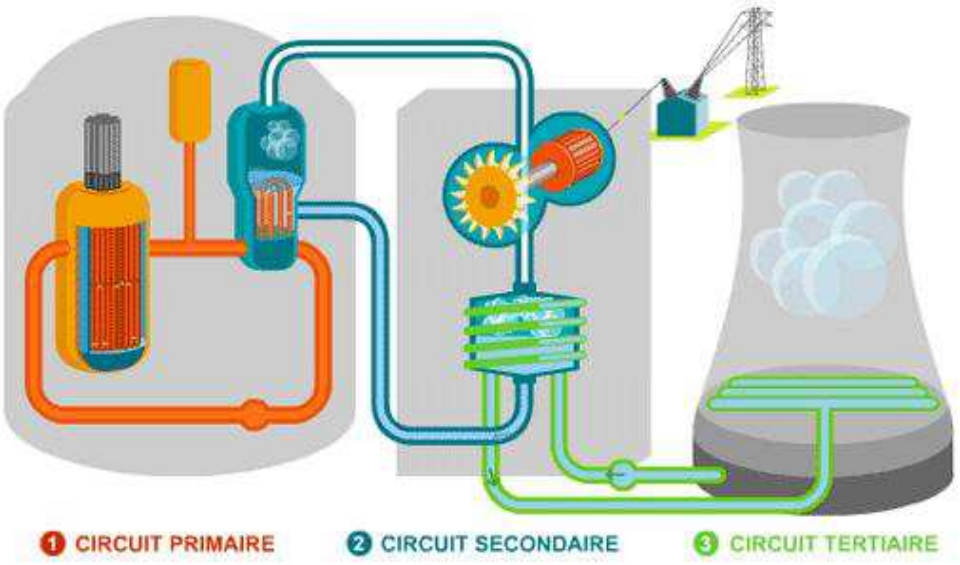


Figure 14 : Mode de fonctionnement et différents circuits d'une centrale électrique (http://encyclopedieelectricite.edf.com/production/industriels/nucleaire/fonctionnement.html)

Le circuit primaire (1) génère de la chaleur qui est utilisée pour chauffer de l'eau sous pression, à 155 bars, à 320°C. Cette chaleur est transmise au circuit secondaire (2) par l'intermédiaire d'un générateur de vapeur dans lequel l'eau du circuit secondaire est vaporisée. La pression engendrée par cette vapeur entraîne un alternateur qui produit un courant électrique alternatif. L'excédent de chaleur est transmis au circuit tertiaire (3) qui permet de contrôler la chaleur importante générée par la production d'énergie.

Les CRF des centrales électriques sont soumis à une réglementation particulière : la réglementation des INB (Installation Nucléaire de Base). Depuis 2005, EDF doit mettre en place des mesures de préventions adéquates afin de maintenir la concentration en *Legionella* spp en dessous de 5.10^6 UFC/L dans l'eau de circuits de refroidissement excepté pour la centrale électrique de Chinon (tours basses de 28 mètres) pour lequel le seuil a été fixé à 5.10^5 UFC/L à cause de la hauteur des tours. La fréquence des analyses est définie en fonction des concentrations en *Legionella* spp., Tableau 3. La réglementation des ICPE étant en cours de révisions, ces seuils sont provisoires.

Tableau 3 : Fréquence des prélèvements de mesure en fonction des concentrations en *Legionella* spp.

Concentrations en *Legionella* spp. (UFC/L)	Fréquence de mesure des *Legionella* spp.
$C \leq 10^3$	mensuelle
$10^3 < C \leq 10^4$	bimensuelle
$10^4 < C \leq 10^5$	hebdomadaire
$C > 10^5$	quotidienne

Le contrôle des concentrations en *Legionella* est effectué par dénombrement sur milieu gélosé (NF T90-431) sur des prélèvements réalisés au niveau du bassin froid (bassin au pied de la TAR) de la TAR.

14. Biocides chimiques

Afin de respecter les réglementations en vigueur sur *Legionella*, des traitements chimiques ou physiques (chocs thermiques et rayonnement UV) sont employés. Les traitements thermiques sont plutôt utilisés pour des réseaux de distribution d'eau chaude sanitaire. La désinfection finale par les UV n'est pas utilisée pour la production d'eau potable car elle ne permet pas de maintenir un résiduel biocide dans le réseau au-delà de la station de traitement, ce qui induit des risques de proliférations dans les zones non traitées. Cette désinfection est plutôt utilisée en traitement d'eaux usées car elle évite le rejet de résiduel polluant à la rivière (Kim *et al.*, 2002). Ces traitements physiques ne seront pas abordés dans cette revue bibliographique.

Les biocides chimiques sont souvent séparés en deux catégories : les biocides non oxydants et les biocides oxydants. Dans cette partie biocide chimique, après une rapide description des principaux biocides non oxydants, les trois principaux biocides oxydants (chlore, monochloramine et dioxyde de chlore) utilisés en désinfection d'eau chaude sanitaire, d'eau potable ou de circuits de TAR seront plus longuement abordés. Du fait de l'implication des amibes dans le cycle de vie de *Legionella*, l'effet des traitements biocides sur les amibes sera également abordé. Pour rappel, cette interaction peut offrir à la bactérie intracellulaire une protection contre les différents désinfectants chimiques, et favorise la multiplication, le transport et l'augmentation potentielle de la virulence (Bichai *et al.*, 2008). Pour terminer, les facteurs physico-chimiques pouvant influencer la désinfection mais aussi le comportement de *Legionella* seront abordés dans la dernière partie de cette bibliographie.

D'autres types de biocides chimiques peuvent être utilisés, il s'agit des ions métalliques comme le cuivre ou l'argent. Les ions cuivre et argent présentent une activité anti-*Legionella* (Kim *et al.*, 2002). Ces ions agissent en interférant avec des enzymes impliquées dans la respiration cellulaire (Domek *et al.*, 1984) ou bien en se liant à des sites spécifiques de l'ADN (Landeen *et al.*, 1989). Lors d'une étude menée par *Unger et al.*, la sensibilité de *Legionella* vis-à-vis de l'ion argent a été déterminée. D'après ces auteurs, et dans leurs conditions de traitement, la MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) après 24 heures d'exposition entraînant une réduction de 5 log est de 64 µg/L d'$AgNO_3$ pour des *Legionella* extracellulaires, supérieure à 4 096 µg/L d'$AgNO_3$ pour des *Legionella* qui se sont multipliées dans les amibes et comprise entre 128 et 512 µg/L d'$AgNO_3$ pour des *Legionella* associées au biofilm (Unger and Luck, 2012). Ces biocides ne seront pas abordés dans cette revue bibliographique.

14.1.Biocides non oxydants

Les biocides non oxydants utilisés contre *Legionella* sont variés : cétones hétérocycliques, guanidines, amides halogénées, glycols halogénés, thiocarbamates, amines, aldéhydes, thiocyanates ou bien encore des composés organiques à base d'étain (pour revue voir (Kim *et al.*, 2002)). D'après ces auteurs, parmi les biocides non oxydants, une amide, le DBNPA (*2,2-DiBromo-3-NitriPropionAmide*) apparaît comme le plus efficace suivi du glutaraldéhyde. D'après Thomas *et al.*, lors de traitements chocs (concentration initiale en DBNA 19 mg/L, en glutaraldéhyde 45 mg/L) menés en pilote mimant une TAR, le DBNA est apparu efficace pour des concentrations supérieures à 8 mg/L et le glutaraldéhyde pour des concentrations supérieures à 27 mg/L (Thomas *et al.*, 1999). Une réduction de 3 log de la population de *L. pneumophila* a été observée après 3 heures de contact. Ces auteurs ajoutent que le glutaraldéhyde serait également efficace sur les *Legionella* présentes dans le biofilm.

L'isothiazoline qui fait partie des cétones hétérocycliques et le 2-bromo-2-nitropropionamide qui appartient à la famille des glycols halogénés sont, d'après Wright *et al.*, efficaces contre *L. pneumophila* aux concentrations de 50 mg/L à 100 mg/L pour les systèmes très encrassés pour le 2-bromo-2-nitro-1,3-propionediol et 9 et 30 mg/L pour l'isothiazoline (Wright *et al.*, 1991). Ces auteurs ajoutent que ces biocides sont relativement efficaces sur des bactéries planctoniques (9-12h) mais que pour des bactéries adhérées les temps de contacts nécessaires sont plus longs (> 48h) pour obtenir a minima 2 log d'abattement. D'une manière générale, les biocides non oxydants sont utilisés à des concentrations allant du mg/L à quelques mg/L (Kim *et al.*, 2002). Ces concentrations indiquent leur relative efficacité comparée aux biocides oxydants.

14.2.Biocides oxydants

Aux Etats-Unis, les réseaux d'eau potables sont traités typiquement à l'aide de chlore ou de monochloramine (Wang *et al.*, 2012). Le chlore est même à l'échelle du continent Nord-Américain, le biocide le plus utilisé pour le traitement d'eau (Rodriguez and Serodes, 2001). Toutefois, le chlore induit la formation de quantités relativement importantes de sous-produits organohalogénés potentiellement toxiques par réaction avec la matière organique. La problématique associée au rejet des composés organohalogénés conduit les exploitants à rechercher des réactifs oxydants alternatifs à moindre potentiel de formations de ces sous-produits.

Parmi ceux proposés, la monochloramine est aujourd'hui utilisée pour la désinfection des CRF de centrale électrique mais son utilisation pour des eaux de distribution n'est pas autorisée en France. Comparée au chlore, la monochloramine présente l'avantage d'être moins réactive que le chlore avec les matières organiques, ce qui engendre moins de sous-produits de désinfection et permet la

conservation d'un résiduel de désinfectant plus longtemps (Cimetiere *et al.*, 2009). La monochloramine pénètrerait également mieux dans les biofilms que le chlore (LeChevallier *et al.*, 1988).

Le dioxyde de chlore est un autre biocide oxydant utilisé comme désinfectant, plutôt en Europe qu'aux USA. Il présente l'avantage de former moins de composés organo-halogénés (THM et acides halo-acétiques) que le chlore libre. Il agit par une réaction d'oxydation et non par une réaction de substitution ou d'addition dans le cas du chlore (Gagnon *et al.*, 2005).

14.2.1. Mode d'action des biocides oxydants

Les biocides oxydants, à l'inverse des antibiotiques, ne présentent pas de cibles spécifiques et peuvent agir sur une ou plusieurs cibles cellulaires (paroi, membrane cellulaire, ADN…), Figure 15.

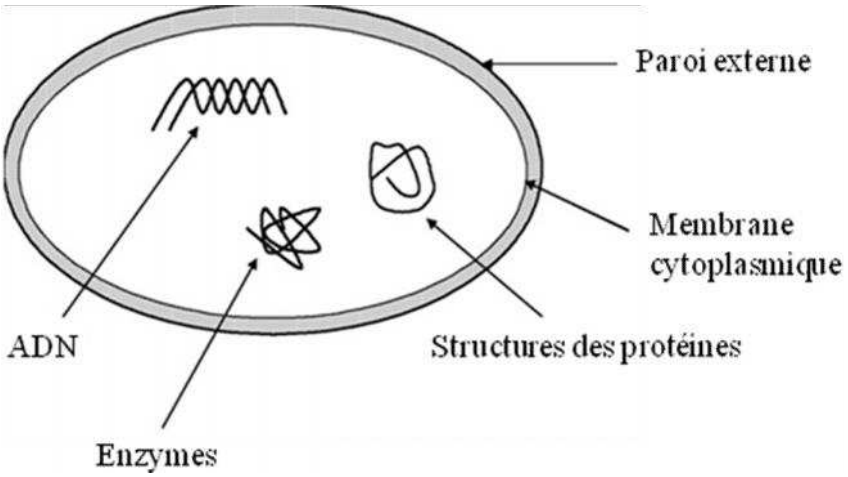


Figure 15 : Cibles cellulaires potentielles pour les biocides oxydants, d'après Malato *et al.*, 2009

Les biocides oxydants sont des substances électronégatives qui sont capables d'arracher 1 ou 2 électrons. Cette oxydation entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont les radicaux libres (anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle $OH^{\bullet}$…) réagissent de manière destructrice sur les composées cellulaires et induisent un stress oxydant. Le mode d'action sera précisé pour chacun des trois biocides (chlore, monochloramine, dioxyde de chlore), par la suite.

14.2.2. Efficacité de biocide et notion de Ct

L'activité anti-microbienne d'un biocide est affectée par différents paramètres parmi lesquels, la concentration du biocide, le temps de contact du biocide avec les micro-organismes, la température, le

pH ainsi que d'autres paramètres chimiques de l'eau comme la présence de matières organiques (Malato *et al.*, 2009).

Dans le but d'évaluer l'efficacité des biocides oxydants sur les micro-organismes, l'inactivation des micro-organismes est calculée, dans des conditions de température, pH et qualité d'eau définies, en fonction du Ct (Concentration résiduelle du désinfectant × Temps de contact). Le Ct permet de comparer la sensibilité des micro-organismes à différents biocides, il est exprimé en mg.min/L. Par exemple, le $Ct_{99,9\%}$ est défini comme l'exposition nécessaire pour inactiver 3 unités logarithmiques de la concentration en micro-organismes. Le calcul du Ct est basé sur la loi de Chick-Watson (Chick, 1908; Watson, 1908) défini par l'équation suivante :

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kC^n t$$

N correspond à la concentration en micro-organismes après exposition au biocide, N_0 est la concentration initiale en micro-organismes, k est la constante de vitesse de désinfection en L/mg min, C est la concentration en biocide en mg/L, t est le temps (min) et n est le facteur de dilution (considéré comme égal à 1 dans le concept de Ct).

14.2.3. Chlore

14.2.3.1. Chimie et équilibre

Le chlore est un oxydant fort, découvert en 1774 par Carl Wilhelm Scheele et largement employé pour la désinfection des eaux potables. Le chlore gazeux (Cl_2) est un gaz jaune-vert soluble dans l'eau qui s'hydrolyse presque instantanément dans l'eau pour former l'acide hypochloreux (HOCl) (A). C'est un acide faible en équilibre avec l'ion hypochlorite ClO^-, (B). La distribution des espèces dépend fortement du pH, Figure 16. Le pKa du couple $HOCl/ClO^-$ est de 7,6 à 20°C ce qui signifie qu'à des pH inférieurs à 7,6, l'espèce prédominante est l'acide hypochloreux (Kim *et al.*, 2002).

Dismutation du chlore : $Cl_2 + H_2O \leftrightarrows HOCl + H^+ + Cl^-$ (A)
Dissociation de l'acide hypochloreux : $HOCl \leftrightarrows ClO^- + H^+$ (B)

L'action désinfectante du produit chloré est essentiellement liée au maintien dans l'eau d'un résiduel d'acide hypochloreux, l'efficacité désinfectante des ions hypochlorites étant plus faible. Dans les CRF, le pH est en général proche de 8, l'espèce largement prédominante est donc l'ion hypochlorite. Ainsi, dans ces conditions, l'efficacité du traitement par chloration ne peut être optimale. Bien qu'il soit facile d'utilisation et que l'acide hypochloreux soit un désinfectant efficace, l'efficacité de désinfection du chlore est fortement dépendante du pH.

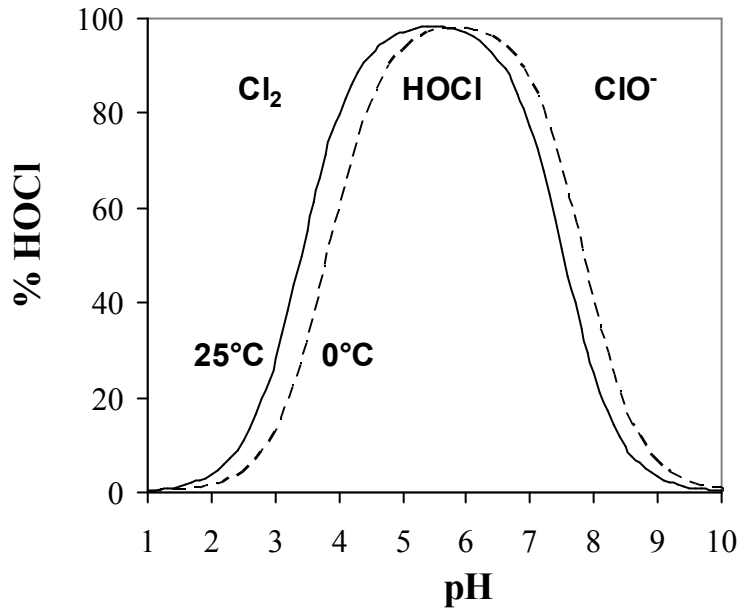


Figure 16 : Equilibre des différentes espèces du chlore dans l'eau en fonction du pH (Cimetiere, 2009)

L'ensemble de ces espèces (Cl_2, HOCl, ClO^-) est communément appelé chlore libre par opposition au chlore combiné comme par exemple la monochloramine. Le chlore total est la somme du chlore libre et du chlore combiné.

Les eaux superficielles contiennent de l'azote ammoniacal qui a une origine naturelle (décomposition des déchets végétaux et animaux). L'ammoniaque se transformant assez rapidement en nitrites et nitrates par oxydation, sa teneur dans les eaux de surface est normalement faible (inférieure à 0,2 mg/l). L'action du chlore sur cet azote ammoniacal entraîne la formation de chlore combiné : chloramines organiques éventuellement formées par l'action du chlore sur des composés organo-azotés, mais surtout chloramines minérales (mono, di et tri-chloramine). Ces réactions avec le chlore consomment une partie du chlore libre disponible, diminuant d'autant la quantité de chlore libre disponible pour la désinfection.

14.2.3.2. Mode d'action

Le chlore et notamment l'acide hypochloreux apparaît comme un oxydant qui n'a pas de cible cellulaire spécifique et réagit avec de nombreux composés cellulaires. Il a des effets sur la chaîne respiratoire, il altère la structure des protéines et cause la perte de viabilité (Albrich and Hurst, 1982), il a aussi un effet direct sur l'ADN (Phe *et al.*, 2005). Pour les micro-organismes, les expositions lors des traitements chimiques sont réalisées avec des solutions contenant du chlore libre ($HOCl/ClO^-$), en proportion variable selon le pH, par contre la concentration est exprimée en équivalent Cl_2.

Sur des bactéries, des altérations de perméabilité membranaire sont visibles pour des expositions, 90 minutes à pH 7,3, 22°C, en Cl_2 inférieures à 0,2 mg/L et des effets sur l'ADN pour des concentrations en Cl_2 supérieures à 0,3 mg/L (Phe *et al.*, 2005). D'après Bodet *et al.*, le chlore initie une réponse au stress chez *L. pneumophila* Lens qui est liée à l'induction de processus de protection cellulaire, reflétant une tentative des bactéries de maintenir l'homeostasie cellulaire (Bodet *et al.*, 2012). Chez les amibes (trophozoites d'*Acanthamoeba*), le chlore engendre de profondes modifications cellulaires : perte des pseudopodes, modification des organelles, condensation cellulaire et augmentation de la perméabilisation cellulaire (Mogoa *et al.*, 2010). L'action du chlore entraîne donc de multiples altérations, membranaires ou cytoplasmiques, engendrant la mort cellulaire ou tout du moins une perte de viabilité.

14.2.3.3. Sensibilité de *Legionella* libres

La sensibilité de *Legionella* au chlore semble plus faible que celle qu'*Escherichia coli*, un coliforme gram négatif, utilisé pour contrôler la qualité microbiologique des eaux potables (Kim *et al.*, 2002). Des traitements en continu, dans des réseaux d'eau potable ou dans un pilote mimant un circuit de refroidissement, avec des concentrations en chlore libre de 0,5 à 1,5 mg/L voire jusqu'à 2,5 mg/L permettent de réduire et de contrôler les populations de la flore microbienne y compris *L. pneumophila* tant que le résiduel est maintenu (Thomas *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 1999). Le résiduel correspond au biocide qui demeure en solution après traitement. Les doses usuelles, utilisées en traitement continu sont de l'ordre de 1 mg/L voire moins (Kim *et al.*, 2002) Des traitements « chocs » peuvent également être employés : une dose massive de chlore est alors injectée dans les systèmes pour obtenir des concentrations en chlore de l'ordre de 20 à 50 mg/L (Lin *et al.*, 1998).

La sensibilité des légionelles, au chlore, a été décrite la première fois par Kutcha *et al.*. Ils ont montré, dans leur étude, un abattement de 2 log de *L. pneumophila* après 60 à 90 minutes pour des *Legionella* issues de réseaux mais après seulement 10 min pour des *Legionella* issues de culture sur milieu gélosé. Pour ce faire, ils ont appliqué une dose initiale de 0,25 mg/L de chlore (21°C, pH 7,6 à 8) (Kuchta *et al.*, 1985). Pour ces auteurs, les légionelles issues des réseaux traités sont moins sensibles aux traitements au chlore que les légionelles issues de culture sur milieu gélosé. Néanmoins, le passage des légionelles de réseaux sur milieu gélosé entraîne une augmentation de leur sensibilité au chlore ; leur sensibilité se rapproche alors de celle des légionelles issues de culture. Ces changements pourraient être dus, selon ces auteurs, à des modifications physiologiques et/ou membranaires. D'après Swango *et al.*, le $Ct_{99,99\%}$ de *L. pneumophila* est de 50 mg.min/L en condition de laboratoire (pH 7, 25°C) (Swango *et al.*, 1987).

14.2.3.4. Sensibilité de *Legionella* associées aux trophozoites

Le passage dans les protozoaires est un autre facteur susceptible d'être à l'origine de la persistance de *Legionella* dans les réseaux. En effet, les protozoaires fréquemment rencontrés dans les rivières, lacs et réseaux pourraient servir de refuge pour les bactéries, pathogènes ou non, lors de la chloration des réseaux (King *et al.*, 1988). En plus de cette protection, le stress engendré par le milieu extérieur, couplé aux effets de la croissance intra-amibienne, pourrait entraîner selon Chang et *al.* une diminution des effets du chlore (Chang *et al.*, 2009). D'après Bichai et *al.*, la survie de certaines bactéries dans des amibes sous forme trophozoite ou kyste pourrait permettre une augmentation de la résistance de ces bactéries au chlore d'un facteur 30 à 120 (Bichai *et al.*, 2008). De ce fait, les stratégies de prévention de la légionellose (dans des installations à risque type TAR) doivent vraisemblablement inclure des traitements efficaces contre les amibes (Philippe *et al.*, 2006). Garcia *et al*. ont rapporté une moindre grande sensibilité au chlore de *L. pneumophila* internalisée dans des trophozoites d'*A. polyphaga* (Garcia *et al.*, 2008) par rapport à des *Legionella* libres. Par contre pour Storey *et al.*, des amibes du genre *Acanthamoeba* peuvent augmenter la sensibilité des *Legionella* aux traitements chlorés. Cette plus grande sensibilité est surprenante, elle s'expliquerait par une activité métabolique plus importante (Storey *et al.*, 2004). Selon Kutcha et *al.*, les amibes du genre *Hartmannella* permettraient la prolifération de *Legionella* même après un traitement au chlore à des doses supérieures à 4 mg/L, pH 7,6-7,8, 20°C (Kuchta *et al.*, 1993).

Par ailleurs, le genre amibien dans lequel *Legionella* se réplique pourrait avoir un effet sur leur sensibilité au chlore. D'après Chang *et al.*, *L. pneumophila* qui se sont multipliées dans les amibes du genre *Hartmannella* sont plus résistantes que celles issues des amibes du genre *Acanthamoeba* (Chang *et al.*, 2009). Le fait que la prolifération de *L. pneumophila* dans les amibes du genre *Hartmannella* soit moins importante que celle dans les amibes du genre *Acanthamoeba*, est pour ces auteurs, un indice que les *Legionella* qui se sont multipliées dans les *Hartmannella* ont subi plus de stress. Les amibes du genre *Acanthamoeba* seraient plus « hospitalières » conférant ainsi à *Legionella* une meilleure résistance à ce biocide.

14.2.3.5. Sensibilité des *Legionella* associées aux kystes

D'après Thomas *et al.*, les kystes notamment ceux d'*Acanthamoeba* pourraient être à l'origine de la recolonisation rapide des réseaux et des circuits. De ce fait, ces auteurs suggèrent que les amibes devraient être considérées comme la principale cible des programmes de désinfection de *Legionella* quel que soit le traitement utilisé (Thomas *et al.*, 2004). En effet, la forme sous laquelle se trouvent les amibes peut également jouer un rôle. En effet, selon Kilvington et Price la protection par les kystes d'*Acanthamoeba* est encore plus importante car ils pourraient protéger *Legionella* pour des doses de

chlore supérieures à 50 mg.min/L, à pH 7,2, 25°C (Kilvington and Price, 1990). L'hypothèse de la survie des légionelles dans les kystes, comme explication au maintien de *Legionella* dans l'environnement après l'application des traitements biocides, avait déjà était émise par Fallon *et al*.. Pour ces auteurs, la survie de *L. micdadei* serait due à des kystes amibiens qui protégeraient cette bactérie contre la désinfection (Fallon and Rowbotham, 1990). Néanmoins, d'autres auteurs, Garcia *et al.*, précisent dans leur étude que les trophozoites d'*A. polyphaga* infectés n'ont pas été capables de s'enkyster lors de leurs traitements au chlore alors que ce fut le cas pour ceux non infectés (Garcia *et al.*, 2007). Dans ce cas là, *Legionella* ne pourrait être retrouvée dans les kystes et ainsi bénéficier de leur protection vis-à-vis du traitement au chlore.

14.2.3.6. Sensibilité des amibes au chlore

Du fait de l'implication des amibes dans le mode de vie de *Legionella* et de leur possible rôle dans la rémanence de *Legionella* dans les réseaux et circuits, la sensibilité au chlore des amibes du genre *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella* est également présentée dans ce paragraphe.

La résistance des amibes au chlore, notamment des kystes, peut varier d'un genre à un autre. Les kystes d'*Acanthamoeba* sont présentés comme les plus résistants au chlore. D'après Kilvington et Price ces kystes résistent à une dose de 50 mg/L (pH 7,2, 25°C) durant plusieurs heures. Les kystes d'*Hartmannella* sont plus sensibles, une dose 10 mg/L, pH 7,6-7,8, 20°C, pendant 30 minutes suffit pour les éradiquer, quant aux kystes de *Naegleria*, ce sont les plus sensibles (Thomas *et al.*, 2009) . Un traitement de 5 à 30 min à une concentration comprise entre 1 et 7 mg/L, pH 7,2-7,3, 25°C, suffit à les éliminer (Chang, 1978). Par ailleurs, les souches environnementales d'amibes pourraient être plus résistantes à certains biocides que les souches de laboratoire (Srikanth and Berk, 1993). Ces auteurs émettent l'hypothèse d'une adaptation de ces souches aux traitements, certains de leurs essais vont même jusqu'à montrer une stimulation de la croissance de ces souches en présence de faible dose de biocide. Loret et Greub, présentent, dans leur article, un tableau estimant les valeurs de $Ct_{99\%}$ de différentes souches d'amibes appartenant au genre *Acanthamoeba* et *Naegleria* pour divers traitements chimiques dont le chlore (Tableau 4) (Loret and Greub, 2010). La différence de sensibilité entre les deux genres est frappante, un facteur d'au moins 100 peut être relevé entre les deux genres. De plus d'après Cursons *et al.*, les trophozoites d'*Acanthamoeba* semblent également être moins sensibles que ceux de *Naegleria* (Cursons *et al.*, 1980). La résistance accrue des kystes d'*Acanthamoeba* pourrait être due à la présence de cellulose dans leur paroi (Thomas *et al.*, 2004).

Tableau 4 : Valeurs d'inactivation ($Ct_{99\%}$) de kystes par le chlore, d'après Loret and Greub, 2010

Amibes	**Température (°C)**	**pH**	**Ct 99% (mg.min/L)**	**Références**
N. fowleri (HB1)	25	7,3-7,4	9-24*	De Jonckheere *et al.*(1976)
N. gruberi (1518/1e)	25	7,3-7,4	9-30*	De Jonckheere *et al.*(1976)
N. spp (HB1,TY,A1)	25	7,2-7,3	28*	Chang (1978)
N. gruberi (NG)	25	7	12,1	Rubin *et al.* (1983)
A. culbertsoni (A1)	25	7,3-7,4	1260-6480*	De Jonckheere *et al.*(1976)
A. spp. 4A	25	7,3-7,4	5040*	De Jonckheere *et al.*(1976)
A. polyphaga	20-22	7,5-8	1300	Loret *et a*l. (2008)

*estimé à partir de la référence

La destruction des kystes amibiens dans les réseaux s'avère donc très difficile car les doses de chlore nécessaires sont très élevées. Par exemple, l'estimation du $Ct_{99\%}$ des kystes d'*A. culbertsoni*, d'après les travaux de De Jonckheere et Van de Voorde, indique des valeurs très élevées entre 1260 et 6480 mg.min/L (pH 7,3-7,4, 25°C) (Tableau 4), ce qui correspond à des doses de biocides difficilement applicables dans les réseaux potables et les circuits. L'utilisation massive de chlore pourrait entraîner des problèmes de corrosion des matériaux mais surtout la production en masse de sous-produits de chloration toxiques comme par exemple les THM (TriHaloMéthane) potentiellement cancérigènes (Wolfe *et al.*, 1984) car le chlore est très réactif avec les composés organiques dissous présents dans les eaux. Concernant *Legionella*, l'association avec tel ou tel genre amibien pourrait avoir une importance puisque les variations de sensibilité aux traitements des différents genres amibiens pourraient se répercuter sur la sensibilité des légionelles qu'ils peuvent abriter.

Concernant les trophozoites, Mogoa et *al.*, ont estimé un $Ct_{99\%}$ de 1,7 mg.min/L, à pH 7, pour des trophozoites d'*A. castellanii* (Mogoa *et al.*, 2011). D'après Cursons et *al.*, une exposition de 30 minutes à 1,25 mg/L de chlore (pH 7, 25°C) permet d'éliminer plus de 99% des trophozoites d'*Acanthamoeba*. La sensibilité, au chlore, de la forme trophozoite est donc beaucoup plus importante que celle de la forme kystique (Cursons *et al.*, 1980).

14.2.4. Monochloramine

14.2.4.1. Chimie

La monochloramine est formée suite à la réaction d'oxydation de l'ammoniaque sur le chlore (Doré, 1989) :

Formation de la monochloramine : $NH_3 + HOCl \rightarrow NH_2Cl + H_2O$

En présence d'un excès de chlore, la dichloramine ($NHCl_2$) et la trichloramine (NCl_3) peuvent également être formées :

Formation de la dichloramine : $NH_2Cl + HOCl \rightarrow NHCl_2 + H_2O$
Formation de la trichloramine : $NHCl_2 + HOCl \rightarrow NCl_3 + H_2O$

L'ensemble des chloramines (NH_2Cl, $NHCl_2$, NCl_3) est communément appelé chlore combiné. Lorsque du chlore et de l'ammoniaque sont mélangés, la spéciation des chloramines dépend des concentrations en azote total et en chlore total. Lorsque le ratio molaire N/Cl est supérieur à 1, la quasi-totalité du chlore est alors combiné sous forme de monochloramine (Figure 17) (Cimetiere *et al.*, 2009).

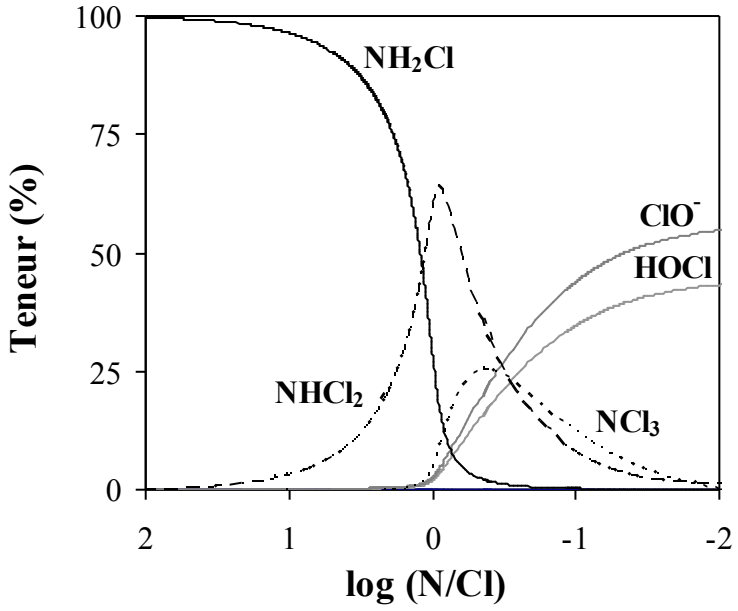


Figure 17 : Distribution des espèces de chlore en fonction du rapport molaire N/Cl
$[Cl_2]$ initial $=1.10^{-4}$ M; [Cl-] = 1.10^{-3} M ; pH = 7,5 ; 25°C (D'après Cimetiere, 2009)

La valeur de pH détermine également quelle espèce de chloramine sera formée. La monochloramine est l'espèce dominante pour un pH supérieur à 7, la dichloramine est présente pour des pH de 3 à 7 et la trichloramine est l'espèce majoritaire pour des pH inférieur à 3 (Wolfe *et al.*, 1984). La dichloramine et la trichloramine ont des pouvoirs désinfectants plus faibles que celui de la monochloramine.

La dégradation de la monochloramine dans les réseaux peut être attribuée à des réactions d'auto-décomposition, à de réactions directes ou indirectes avec la matière organique induisant la formation de chlore libre par hydrolyse de la monochloramine (Cimetiere *et al.*, 2009). Néanmoins, les résiduels de monochloramine sont plus stables et ont une période d'action plus longue que le chlore libre ou le dioxyde de chlore.

14.2.4.2. Mode d'action

La monochloramine est un oxydant puissant (potentiel d'oxydo-réduction de 1,527 pour le couple NH_2Cl/Cl^-), mais son action de désinfection semble plus lente que celle du chlore (Wolfe *et al.*, 1984). Son mode d'action n'est pas très bien défini. Il semble différent de celui du chlore aussi bien pour les bactéries (LeChevallier *et al.*, 1988; Watters *et al.*, 1989), que pour les amibes (Mogoa *et al.*, 2011). D'après certains auteurs, la monochloramine (pH 8, 25°C) agirait sur des protéines membranaires ce qui entraînerait la mort des bactéries (LeChevallier and Au, 2004). Par contre, après traitement à la monochloramine la membrane et les acides nucléiques semblent peu endommagés (Jacangelo *et al.*, 1991). Par ailleurs, les mécanismes de protection, pour les bactéries, sont probablement différents de ceux mis en œuvre lors des traitements au chlore (LeChevallier *et al.*, 1988). Chez les amibes du genre *Acanthamoeba* pour des traitements d'une minute à pH 7, le biocide n'entraîne pas de modification de taille et de perméabilisation des cellules (Mogoa *et al.*, 2011). D'après ces auteurs, l'inactivation des cellules serait donc due à l'inhibition de certaines protéines associées à des métabolismes cellulaires tels que la respiration cellulaire ou le transport membranaire.

14.2.4.3. Sensibilité de *Legionella*

La monochloramine est plus stable que le chlore mais est un désinfectant moins efficace (Kim *et al.*, 2002). Néanmoins, elle est efficace pour la désinfection de *Legionella* sessile et planctonique (Loret *et al.*, 2005). Récemment Jakubek *et al*., ont déterminé le $Ct_{99,9\%}$ (pH 7,5-8,5, 25°C-35°C) de plusieurs souches environnementales de *L. pneumophila* (Jakubek *et al.*, 2013b). Lors de cette étude, les valeurs de $Ct_{99,9\%}$ ont varié de 16,14 à 64,88 mg.min/L. D'autres auteurs, Cunliffe *et al.*, ont estimé, auparavant, le $Ct_{99\%}$ de *L. pneumophila* à 15 mg.min/L (30°C, pH 8,4-8,6) (Cunliffe, 1990).

Des études menées sur des pilotes ont également montré l'efficacité de la monochloramine sur *Legionella*. Lors de leur étude, Thomas *et al.*, ont constaté qu'un traitement continu, dans leur pilote, à une concentration en monochloramine de 0,5 mg/L entrainait une importante augmentation de la proportion de biomasse morte mais des bactéries restaient vivantes dans le biofilm. Néanmoins, après 35 jours, *Legionella* n'a plus été détectée (Thomas *et al.*, 2004). Williams et Braun-Howland, ont détecté *L. pneumophila*, par méthode FISH, dans des biofilms après un traitement de 155 minutes, à 4 mg/L, mais pas après 2 semaines de traitements (Williams and Braun-Howland, 2003). Ces deux études montrent l'efficacité de la monochloramine sur le long terme vis-à-vis des *Legionella* présentes dans les biofilms.

14.2.4.4. Sensibilité des amibes à la monochloramine

La sensibilité des amibes libres à la monochloramine est peu décrite dans la littérature. Mogoa *et al.* donnent une valeur de $Ct_{99,9\%}$ de 29,9 mg.min/L, à pH 7, pour des trophozoites du genre *Acanthamoeba* (Mogoa *et al.*, 2011). Pour les kystes, peu de valeurs de Ct sont disponibles dans la littérature, Loret et Greub ont compilé les données disponibles pour dresser un tableau de la sensibilité des kystes de *Naegleria* à la monochloramine (Loret and Greub, 2010). La gamme de $Ct_{99\%}$ est très grande, elle va de 23 à 237 mg.min/L, soit un facteur 10 entre la plus faible et la plus haute valeur. Il s'avère donc difficile de se prononcer sur la protection de *Legionella* par les amibes.

La monochloramine est moins efficace sur *Legionella* que le chlore lorsque l'on compare les Ct mais elle présente l'avantage d'être moins réactive avec la matière organique, ce qui permet de maintenir un résiduel dans des eaux de réseaux ou de circuits plus longtemps et de générer moins de sous-produits de chloration (AOX, THM). La monochloramine pénètrerait également mieux les biofilms que le chlore et pourrait donc être plus efficace sur les micro-organismes des biofilms (Cimetiere *et al.*, 2009; LeChevallier *et al.*, 1988).

14.2.5. Dioxyde de chlore

14.2.5.1. Chimie

Le dioxyde de chlore (ClO_2) est, à température ambiante, un gaz de couleur jaune-vert qui est fabriqué in-situ car il se décompose rapidement (Kim *et al.*, 2002). Il peut être produit par réaction entre le chlorite de sodium et un acide fort:

Formation du dioxyde de chlore : $5\ NaClO_2 + 4\ HCl \rightarrow 4\ ClO_2 + 5\ NaCl + 2\ H_2O$

Le dioxyde de chlore a une grande capacité d'oxydation. Il accepte cinq électrons lorsqu'il est réduit en ion chlorure, ce qui, basé sur le poids moléculaire et le nombre d'électrons transféré, lui permet d'être 263% plus disponible que le chlore et représente 2,5 fois les capacités d'oxydation du chlore (Junli *et al.*, 1997). Il présente également l'avantage d'être efficace sur une gamme de pH plus large que celle du chlore et est plus soluble dans l'eau (10 fois plus). Il diminue le goût et les odeurs produits lors de la chloration des eaux potables car lors de la chloration, les phénols peuvent être convertis en chlorophénols sapides ce qui n'est pas le cas avec le dioxyde de chlore (Kim *et al.*, 2002). De plus, le dioxyde de chlore ne réagit ni avec l'ammoniaque, ce qui évite la formation de chloramines, ni avec les amines primaires ou secondaires limitant ainsi la demande en chlore (Gagnon *et al.*, 2005). Néanmoins le dioxyde de chlore présente des inconvénients : il peut engendrer la formation de chlorite (ClO_2^-) et de chlorate (ClO_3^-) qui sont des composés toxiques à des concentrations élevées et il cause des odeurs lorsqu'il est utilisé à des concentrations supérieures à 0,5 mg/L. Son utilisation entraîne la formation de chlorite et de chlorate dont l'efficacité de désinfection est discutable notamment pour les chlorites (Gagnon *et al.*, 2005). Il faut également rajouter que le dioxyde de chlore se décompose à la lumière et est très volatil.

14.2.5.2. Mode d'action

Bernade *et al.*, soulignent l'effet rapide (quelques secondes) du dioxyde de chlore sur les bactéries. Pour ces auteurs le dioxyde de chlore agirait en perturbant la synthèse protéique (Benarde *et al.*, 1967). Le dioxyde de chlore pénètrerait facilement la membrane cellulaire, inhiberait la respiration cellulaire et les phosphotransférases. Les activités enzymatiques des protéines seraient également atteintes, ce qui entraînerait la mort cellulaire (Junli *et al.*, 1997). Plus récemment, d'autres auteurs ont confirmé que le dioxyde de chlore cause la dénaturation des protéines notamment en raison d'une action sur les résidus tryptophane et tyrosine (Ogata, 2007). Au final, le dioxyde de chlore présente une activité bactéricide rapide et sur une gamme de pH plus grande que celle du chlore (Junli *et al.*, 1997).

14.2.5.3. Sensibilité de *Legionella*

La sensibilité de *Legionella* au dioxyde de chlore est très peu décrite dans la littérature, néanmoins elle semble très élevée. Une étude menée sur un réseau d'eau chaude hospitalier, indique qu'après un traitement choc au dioxyde de chlore à une concentration comprise entre 50 et 80 mg/L pendant une heure suivi d'un traitement continu maintenant un résiduel compris entre 3 et 5 mg/L est suffisant pour éliminer *Legionella* dans les phases eau et biofilm (Walker *et al.*, 1995). D'autres auteurs, Srinivasan *et al.*, rapportent aussi l'efficacité de ce traitement dans un réseau d'eau hospitalier pendant 17 mois à 0,8 mg/L, pendant 12 heures par jour et 5 jours sur 7. Le pourcentage de sites où *Legionella* a été détectée est passé de 41% avant traitement à 4% après 510 jours (Srinivasan *et al.*, 2003). Récemment,

Marchesi *et al.*, ont comparé différents traitements utilisés pour le contrôle de *Legionella* dans un réseau d'eau hospitalier. Le chlore et le dioxyde de chlore ont fait partie des traitements testés. En terme d'efficacité de réduction du nombre de points du réseau présentant des concentrations en *Legionella* supérieures à 10^4 UFC/L, le dioxyde de chlore est plus efficace que des traitements chlore choc (Marchesi *et al.*, 2011). L'utilisation du chlore en traitement choc (20-50 mg/L pendant 1 à 2 heures) a une efficacité limitée et temporaire. Les auteurs concluent leur étude en soulignant que les concentrations en dioxyde de chlore dans les réseaux doivent être conduites avec attention, des concentrations en résiduel inférieures à 0,3 mg/L rendent le traitement inefficace (concentration en *Legionella* supérieure à 100 CFU/L).

Au vu de ces études, le dioxyde de chlore s'avère efficace sur *Legionella* et assure une bonne désinfection. Néanmoins, d'après Hamilton *et al.*, le dioxyde de chlore (à pH 6,5-7,5, traitement continu à 0,5 mg/L) peut abattre les concentrations en *Legionella* mais peut rarement l'éradiquer du réseau malgré le fait qu'il soit considéré comme plus efficace que le chlore pour contrôler *Legionella* même en présence de biofilm (Hamilton *et al.*, 1996).

14.2.5.4. Sensibilité des amibes au dioxyde de chlore

Tout comme pour *Legionella*, le dioxyde de chlore semble plus efficace que le chlore et la monochloramine vis-à-vis des amibes y compris sur les formes kystiques. Les valeurs de $Ct_{99\%}$, fournies par Loret et Greub, sont toutes inférieures à 6 mg.min/L pour les kystes de *Naegleria*, Tableau 5. L'efficacité du dioxyde de chlore sur les kystes de *Naegleria* suggère que la protection apportée par ces kystes est moindre que lors des traitements au chlore où les kystes d'*Acanthamoeba* s'avèrent très difficile à éliminer.

Pour les trophozoites, Mogoa *et al.* ont estimé la sensibilité d'une souche de laboratoire *d'Acanthamoeba castellanii*, le $Ct_{99,9\%}$ (pH 7) est alors de 1,5 mg.min/L c'est-à-dire du même ordre que celui de *Legionella* (Mogoa *et al.*, 2011).

Tableau 5 : Valeurs d'inactivation ($Ct_{99\%}$) des kystes par le dioxyde de chlore, d'après Loret and Greub, 2010

Amibes	**Température (°C)**	**pH**	**Ct 99% (mg.min/L)**	**Références**
N. gruberi	25	7	5,5*	Chen *et al.* (1985)
N. fowleri (2 strains)	25	8-9	0,9-1,2*	Pringuez *et al.* (2001)
N. lovaniensis	25	8-9	1,7-2,7*	Pringuez *et al.* (2001)
A. polyphaga	20-22	7,5-8	20	Loret *et al.* (2008b)

*estimé à partir de la référence

Le dioxyde de chlore est donc particulièrement intéressant pour son activité de désinfection qui semble être rapide et efficace.

15. Paramètres impactants l'efficacité des biocides oxydants et *Legionella*

Dans les réseaux et les circuits, l'efficacité de désinfection des biocides oxydants sur *Legionella*, peut être diminuée par différents facteurs dépendants :

- Des bactéries elles-mêmes ou leur association ou non au biofilm
- Des matériaux des réseaux et circuits qui peuvent avoir une action sur le biocide et sur *Legionella*.
- Des conditions de température, temps de séjour, hydrodynamisme…qui peuvent également agir le biocide comme sur les bactéries

15.1.Facteurs microbiens

En plus de la protection potentielle apportée par les amibes, les bactéries disposent de mécanismes de résistance et d'adaptation au stress qui sont plus ou moins exprimés selon leur état physiologique. Leur présence dans les biofilms est également un facteur de protection vis-à-vis des biocides, le biofilm protégeant les bactéries des agents toxiques et donc des biocides (Morton *et al.*, 1998).

15.1.1. Effet physiologique

Dans les réseaux, *L. pneumophila* est capable de persister malgré des traitements biocides. Lors de leur étude Garcia *et al*. ont mis en évidence la persistance d'une souche de *L. pneumophila*, appartenant au sérogroupe 1, pendant 17 ans dans un réseau d'eau hospitalier traité au chlore (Garcia *et al.*, 2008). Malgré, la persistance de cette souche, les auteurs ont conclu que le manque d'efficacité du traitement n'était pas dû à une baisse de la sensibilité de la bactérie au chlore. Ces auteurs, n'ont pas non plus incriminé l'état physiologique de la bactérie comme hypothèse pour la persistance de *Legionella* mais la présence de la flore interférente qui, selon eux, pourrait favoriser cette persistance. Une autre étude, pointe du doigt également, la capacité de *L. pneumophila* à résister aux traitements chimiques sur le long terme. Une perte rapide de cultivabilité ainsi que des dommages membranaires sont constatés lors des traitements au chlore mais il se pourrait que les *Legionella*, qui sont métaboliquement peu actives dans les réseaux, aient développé un phénotype permettant une meilleure résistance aux traitements (Chang *et al.*, 2007). Les carences prolongées en nutriments pourraient entraîner des modifications dans les constituants extérieurs de la membrane, comme par exemple un épaississement de la paroi, ce qui interagirait alors avec le biocide et aurait comme conséquence une diminution du résiduel disponible pour l'inactivation de la cellule. Une plus faible efficacité des biocides sur des *Legionella*,

issues d'un réacteur par rapport aux données sur des bactéries de laboratoire a été également constatée (Thomas *et al.*, 1999). En plus de la protection physique qu'apportent les amibes, les *Legionella* intracellulaires sont décrites comme plus résistantes aux stress comparées à des *Legionella* issues de culture grâce à l'activation du gène gspA (*Global Stress Protein gene*) (Abu Kwaik *et al.*, 1997). L'addition de l'effet de la croissance dans les amibes et du stress engendré par des carences nutritives dans les réseaux et circuits pourrait réduire l'efficacité de désinfection sur des bactéries traitées au chlore (Chang *et al.*, 2007).

Le stade VBNC qui constitue un stade physiologique particulier (arrêt de la croissance, réduction de l'activité métabolique, épaississement de la paroi), est décrit comme permettant une survie à long terme de *Legionella* même après des traitements biocides (Alleron *et al.*, 2008). Par ailleurs, Ayyildiz *et al.* indiquent que les bactéries en phase stationnaire prolongée seraient plus difficiles à éliminer que les bactéries en phase exponentielle de croissance car elles possèdent plus de polysaccharides dans leur paroi, ce qui leur assureraient une meilleure résistance (Ayyildiz *et al.*, 2009). Pour Kutcha *et al.*, les différences de sensibilité entre des *Legionella* issues de culture et d'autres issues de réseaux seraient plutôt dues à des modifications physiologiques qu'à des modifications génétiques (Kuchta *et al.*, 1985).

Au final, les mécanismes permettant aux *Legionella* de réseaux ou métaboliquement moins actives d'être moins sensibles aux traitements biocides seraient des mécanismes d'adaptation régulés plutôt par des mécanismes physiologiques que par des modifications génétiques (Kuchta *et al.*, 1985). Le fait que les biocides réagissent avec de nombreux éléments cellulaires rend difficile l'acquisition de résistance aux biocides à contrario de ce qui existe pour les antibiotiques. Néanmoins selon Braoudaki et Hilton, il pourrait exister un lien, chez les bactéries, entre la résistance aux antibiotiques et celles aux biocides via un mécanisme commun de résistance comme par exemple une réduction non spécifique de la perméabilité membranaire ou bien la présence de pompes à efflux mais ces hypothèses n'ont jamais été vérifiées (Braoudaki and Hilton, 2004). L'épaississement et/ou des modifications de la membrane permettraient, quant-à-elles, de freiner la pénétration du biocide dans la cellule et de diminuer le résiduel disponible en réagissant avec le biocide. Les modifications physiologiques comme l'activation de l'expression de protéines impliquées dans des mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydatif (protéines anti-oxydantes et protéines de stress), chez *L. pneumophila*, pourraient être impliquées dans des phénomènes d'adaptation et de résistance aux traitements chlorés (Bodet *et al.*, 2012).

15.1.2. Protection du biofilm

Le biofilm est considéré, de par sa structure, comme offrant une protection aux bactéries. En plus d'une protection physique, le biofilm peut également offrir une protection physiologique aux bactéries. Hindré *et al.*, ont montré que deux clusters de gènes étaient particulièrement induits chez *Legionella* dans le biofilm. Un de ces clusters correspond à une enzyme impliquée dans la réponse au stress oxydatif (alkyl hydroperoxide reductase) (Hindre *et al.*, 2008). D'après Cooper et Hanlon, *L. pneumophila* est capable de résister à un traitement au chlore, à température ambiante, jusqu'à 0,5 mg/L sous forme planctonique et 200 mg/L sous forme sessile (Cooper and Hanlon, 2010). Dans le paragraphe précédent, il a été vu que l'état physiologique de *Legionella* avait un impact sur l'efficacité des biocides. Dans le biofilm, des bactéries « dormantes » exprimant des phénotypes de résistance sont rencontrées, ce qui leur confère une protection physiologique.

Le deuxième mode protection du biofilm proviendrait de la matrice d'exopolymères formant le biofilm qui est susceptible de limiter la diffusion du biocide, établissant un gradient de concentration, réduisant ainsi l'inactivation des micro-organismes par le biocide (Maillard, 2007). Ainsi, pour une concentration de désinfectant, un temps de contact plus long est requis pour inactiver des bactéries sessiles par rapport à des bactéries planctoniques. D'après Wright *et al*., l'effet de deux biocides (le Bronopol et le Kathon) prend 4 fois plus de temps pour agir sur des *Legionella* sessiles que pour celles qui sont planctoniques (Wright *et al.*, 1991). Tous les biocides n'ont pas la même efficacité pour pénétrer dans le biofilm ; ainsi le chlore semble mal pénétrer dans les biofilms alors que la monochloramine et le dioxyde de chlore semble avoir une meilleure pénétration (LeChevallier *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1995). La monochloramine pénétrerait 170 fois plus vite dans le biofilm que le chlore libre (Lee *et al.*, 2011). Les concentrations en chlore dans le biofilm pourraient ne représenter que 20% des concentrations dans la phase eau (De Beer *et al.*, 1994). Néanmoins, le chlore a une meilleure efficacité que la monochloramine, à concentration égale (2,6-2,7 mg/L) pour inactiver les micro-organismes à la surface du biofilm (Lee *et al.*, 2011).

Comparé aux bactéries planctoniques, la moindre sensibilité des *Legionella* sessiles due à la double protection physique et physiologique, requiert l'utilisation de doses de biocide plus importantes (Sanli-Yurudu *et al.*, 2007).

15.2.Facteurs physico-chimiques

Les facteurs physico-chimiques sont des paramètres qui influencent directement la chimie des biocides oxydants et peuvent réduire ou augmenter leur efficacité. Les facteurs influant l'efficacité de désinfection peuvent être classés en trois catégories :

- Les éléments qui influent sur l'activité des désinfectants (pH, température)
- Les éléments qui interfèrent avec la disponibilité des désinfectants (composés organiques et inorganiques réduits comme le fer, les sulfures et l'ammoniaque)
- Les éléments qui interfèrent avec l'accessibilité des micro-organismes (MES (Matières En Suspension), biofilm) (Barbeau *et al.*, 2005).

Les facteurs physico-chimiques de l'eau peuvent également impacter directement ou indirectement la population de *Legionella*. En plus de la température et du pH, qui ont une influence sur la croissance de *Legionella* (Ohno *et al.*, 2003); (Fliermans *et al.*, 1981), d'autres éléments physico-chimiques peuvent également avoir une influence comme certaines concentrations en métaux. Ces effets sont décrits par la suite.

15.2.1. Effet de la température et du pH

D'après Barbeau *et al.*, la température est la variable qui a le plus d'impact sur l'activité des biocides oxydants (Barbeau *et al.*, 2005). D'autres auteurs, Fisher *et al.*, ont mis au point un modèle afin de décrire l'effet de la température sur la décroissance du chlore dans 3 types d'eau différentes prélevées dans 3 villes australiennes. Ce modèle montre une augmentation de la décomposition du chlore à des températures plus élevées (28°C) qu'à 4°C (Fisher *et al.*, 2012). La température augmente les cinétiques de décomposition mais également celles de la désinfection. Ainsi pour une température de 43°C, l'efficacité de désinfection du chlore est augmentée par rapport à un traitement effectué à 25°C (Muraca *et al.*, 1987). Néanmoins l'augmentation de la température requiert des doses de traitements un peu plus élevées pour compenser les pertes en décomposition. D'après, Muraca *et al.*, 120% de la dose de chlore est nécessaire pour un traitement à 43°C par rapport à un traitement à 25°C (Muraca *et al.*, 1987). De plus, pour rappel, les températures de 25 à 42°C s'avèrent être les plus favorables pour le développement de *Legionella* (Fields *et al.*, 2002). En règle générale, les cinétiques chimiques sont accélérées avec l'augmentation de la température. Pour la monochloramine et le dioxyde de chlore, une compétition entre les réactions permettant la désinfection des micro-organismes et d'autres réactions avec la matrice du milieu a également lieu.

Pour le chlore libre, outre la température, c'est le rôle du pH qui a peut être le plus d'impact sur l'activité du biocide (Barbeau *et al.*, 2005). L'équilibre entre les espèces HOCl et ClO^- est dépendante du pH, l'ion hypochlorite ayant une plus faible activité biocide que l'acide hypochloreux. L'action du dioxyde de chlore et de la monochloramine est moins sensible à cet effet de pH. En plus d'une action directe sur la chimie du biocide, le pH pourrait avoir une action plus indirecte en influant sur la biologie. Une modélisation réalisée par Berck et *al.* indique que le nombre de micro-organismes associés aux amibes serait impacté par le pH et le carbone organique dissous. Plus ces deux paramètres

sont élevés, plus le nombre d'amibes infectées est important. Le maximum de fréquence est observé pour un pH situé entre 8 et 9 (Berk *et al.*, 2006). Yamamoto *et al.* relèvent également une corrélation entre *Legionella*, la température et le pH, dans des eaux de TAR. En effet, lors de leur étude, les concentrations en légionelles ont été plus importantes pour des eaux présentant un pH de 8,4 à 9,1 et une température comprise entre 26°C et 30°C (Yamamoto *et al.*, 1992). Cette gamme de pH optimale est un peu plus faible pour Ohno *et al.*, puisqu'elle va de pH 6 à pH 8 (Ohno *et al.*, 2003). Le pH pourrait donc avoir une influence sur les concentrations en *Legionella*, et sur l'efficacité de désinfection du chlore.

15.2.2. Effet des ions et des éléments dissous

Le chlore est consommé par réaction avec la matière organique mais aussi par les substances inorganiques comme le fer, le manganèse ou l'ammoniaque (Fisher *et al.*, 2012). La composition des matériaux du réseau peuvent avoir une influence sur le biocide. Ainsi, Lehtola *et al.*, rapportent que les tuyaux en cuivre consomment plus vite le chlore que ceux en PVC, un dosage plus élevé en chlore serait alors requis (Lehtola *et al.*, 2005). L'âge du réseau entraînant des changements dans la surface des matériaux semble influencer la consommation du chlore notamment pour les réseaux en fonte ou en acier (Al-Jasser, 2007). La corrosion du fer dans les réseaux interfère avec le chlore et les chloramines, causant une détérioration de la qualité d'eau (Wang *et al.*, 2012). La corrosion des réseaux peut être limitée par l'utilisation d'agents anti-corrosion, mais l'utilisation d'agents anti-corrosion dans les eaux de TAR, tels que le phosphate et les additifs de molybdate, pourrait réduire l'efficacité de certains biocides comme l'isothiazolone ou le brome (Critchley and Bentham, 2009). Outre le chlore, les autres biocides sont également sensibles à ces composés dissous. Par exemple, le dioxyde de chlore interfère avec les groupements sulfurés, amines (secondaires et tertiaires) et phénoliques de la matière organique (Ayyildiz *et al.*, 2009). Plus leur concentration est élevée plus l'efficacité du biocide est réduite.

La présence de certains métaux et minéraux a été corrélée à *Legionella* dans plusieurs études mais les résultats montrent des effets contradictoires. Pour Rakic *et al.*, le fer et le manganèse sont corrélés positivement avec *Legionella* et le zinc négativement (Rakic *et al.*, 2012). Pour Bargellini et *al.*, une concentration en manganèse inférieure à 6 µg/L serait un bon indicateur de l'absence de *Legionella* (Bargellini *et al.*, 2011). D'après States *et al.*, dans les réseaux, la corrosion peut entraîner la libération de fer, ce qui favoriserait le développement de *Legionella* (States *et al.*, 1985). D'autres éléments comme le zinc, le potassium, le manganèse et même le cuivre pourraient favoriser, à faibles concentrations (inférieures au mg/L), le développement de *Legionella* (Reeves *et al.*, 1981; States *et al.*, 1985). Néanmoins des concentrations en métaux plus élevées (10-100 mg/L) sont toxiques (States *et al.*, 1985). Pour Kusnetsov *et al.*, *Legionella* est favorisée dans des eaux à faibles concentrations en

fer et en manganèse (Kustnetsov *et al.*, 1993). Plus récemment, une étude menée dans un réseau d'eau chaude par Borella *et al.*, indique que des concentrations en cuivre supérieures à 50 µg/L mais faibles en fer (inférieure à 20 µg/L), zinc (inférieure à 100 µg/L) et manganèse (inférieure à 3 µg/L) seraient corrélées à l'absence de colonisation par *Legionella* confirmant le rôle de promoteurs ou d'inhibiteurs de ces éléments (Borella *et al.*, 2004).

L'effet de la dureté de l'eau sur la *Legionella* est également controversé. Des associations positives (Lasheras *et al.*, 2006), négatives (Kustnetsov *et al.*, 1993) et même des tendances en U, c'est-à-dire un minimum de colonisation pour des valeurs de dureté moyenne (25-35 °F) (Bargellini *et al.*, 2011) ont été décrites. Il est donc difficile d'établir un lien entre *Legionella* et un quelconque paramètre concernant les concentrations en minéraux et métaux de l'eau.

15.2.3. Effet des MES

Le biofilm a un rôle sur la disponibilité des biocides. Il représente une barrière physique plus ou moins facilement pénétrable selon le biocide ce qui va consommer, au moins en partie, la quantité de biocide disponible pour la désinfection. Cet effet a été précédemment décrit, seul le rôle des MES va être discuté ici.

D'après l'étude de Barbeau *et al.*, les cinétiques d'inactivation par le chlore de *Bacillus subtilis*, dans des eaux ultra-pures et des eaux naturelles ne sont pas statistiquement différentes (Barbeau *et al.*, 2005). De plus, la filtration des eaux sur membrane de porosité de 0,45 µm n'a pas d'effet sur la désinfection au chlore et au dioxyde de chlore. Pour ces auteurs, il n'y aurait pas d'effet des matières organiques particulaires. Il a été spéculé que les matières particulaires pourraient protéger les micro-organismes en créant une demande en biocide ou en apportant une protection physique. D'après Narkis *et al.*, l'efficacité de désinfection au dioxyde de chlore dépend d'une part de la sensibilité du micro-organisme au biocide et d'autre part de la pénétration de ce biocide dans la particule solide (Narkis *et al.*, 1995). Une étude plus récente semble indiquer que la composition, la taille et la structure de ces particules seraient plus importantes que leur quantité (Kahler *et al.*, 2010). D'après Dickenson et Sansalone, les matières particulaires type sédiments (supérieures à 75 µm) offre une protection aux micro-organismes et ont ainsi un effet négatif sur la désinfection. Par contre, les matières particulaires plus petites n'offriraient pas de protection car la taille des pores serait trop petite, les micro-organismes resteraient alors à la surface (Dickenson and Sansalone, 2011).

En conclusion, les facteurs physico-chimiques en plus de l'influence qu'ils peuvent avoir sur la croissance et le développement de *Legionella*, ont un effet direct sur les biocides utilisés. Les caractéristiques chimiques des biocides les amènent à réagir avec des éléments, dissous ou non,

présents dans l'eau, consommant ainsi une partie du biocide qui ne sera plus disponible pour la désinfection. Les paramètres pH et température ont un effet sur les équilibres chimiques et les cinétiques de désinfection et de dégradation de ces biocides.

MATERIEL ET METHODES

1. Souches de micro-organismes

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude sont référencées dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6: Souches bactériennes utilisées au cours de l'étude

Souches	Origine
Legionella pneumophila Lens (sg 1)	CNRL de Lyon
Legionella pneumophila QEE 6945 (sg 1)	Dampierre tranche 4 ; 31-05-2010 (EDF)
Legionella pneumophila QEE 4795 (sg 1)	Cattenom, 25-08-2005 (EDF)
Escherichia coli XL1-blue	Stratagène

La souche *L. pneumophila* Lens a été fournie par le CNRL (Centre National de Référence des Légionelles), il s'agit de la souche responsable de l'épidémie qui a eu lieu fin 2003 dans la région de Lens.

Les souches amibiennes utilisées lors de cette étude ainsi que leur origine sont référencées dans le Tableau 7. Toutes les souches d'amibes utilisées sont issues de prélèvements environnementaux.

Tableau 7: Souches amibiennes utilisées au cours de l'étude

Souches	Origine et date de prélèvement
Acanthamoeba V1	fournie par Véolia
Acanthamoeba S2	fournie par EDF
Acanthamoeba M3	fournie par EDF
Acanthamoeba 191	Dampierre tranche 2 ; 03-11-2008 (EDF)
Acanthamoeba 116	Dampierre tranche 2 ; 25-08-2008 (EDF)
Acanthamoeba 137	Civaux tranche 2 ; 15-09-2008 (EDF)
Acanthamoeba 073	Civaux tranche 2 ; 26-05-2008 (EDF)
Naegleria 117	Dampierre tranche 2 ; 25-08-2008 (EDF)
Naegleria 135	Civaux tranche 2 ; 15-09-2008 (EDF)
Naegleria 161	Cruas tranche 1 ; 20-10-2008 (EDF)
Naegleria 242	Cattenom ; 07-12-2009 (EDF)
Naegleria lovaniensis	fournie par EDF
Hartmannella 113	Dampierre tranche 2 ; 25-08-200 (EDF)
Hartmannella 082	Civaux tranche 2 ; 26-05-2008 (EDF)
Hartmannella 063	Cruas tranche 1 ; 19-05-2008 (EDF)
Hartmannella 251	Cattenom ; 25-01-2010 (EDF)
Hartmanella vermiformis CCAP 1534/7A	fournie par Lorenzo Morales

2. Milieux et conditions de culture des micro-organismes

2.1.Culture de *Legionella*

Les 3 souches de *L. pneumophila* ont été cultivées de façon identique lors de cette étude. Les cultures ont été effectuées à 37°C :

- Soit en milieu liquide BYE (*Buffer Yeast Extract*) sous agitation à 150 rpm en erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de BYE.
- Soit sur milieu gélosé BCYE (*Buffer Charcoal Yeast Extract*) ou sur milieu GVPC : BCYE supplémenté en *Glycine, Vancomycine, Polymyxine B et Cycloheximide*.

Le milieu BYE est composé, pour un litre, de 5 g d'ACES, de 10 g d'extrait de levure puis le pH est ajusté à 6,9 ± 0,1 à l'aide de KOH 10 N. Le milieu est stérilisé par filtration sur membrane de porosité 0,22 µm puis complémenté en L-cystéine (0,4 g/L final) et pyrophosphate de fer (0,25g/L final) préalablement filtrée sur membrane 0,22 µm.

Le milieu BCYE est préparé à partir de BYE non filtré dans lequel est ajouté, pour un litre, 2 g de charbon actif et 15 g d'agar. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes puis complémenté comme précédemment en pyrophosphate de fer et L-cystéine. Pour le milieu GVPC, il a été préparé en mélangeant 490 mL de BCYE (déjà complémenté) avec 10 mL d'un mélange commercial d'antibiotique (Glycine 3g/L, Vancomycine 1 mg/L), Polymyxine B 80000 UI, Cycloheximide 80 mg/L) fraîchement réhydraté à l'aide d'eau milliRO stérile.

2.2.Culture d'*Escherichia coli*

La bactérie a été cultivée en milieu liquide LB (*Luria-Bertani*) à 37°C, en erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de LB, sous agitation à 200 rpm. Le milieu LB est composé, pour un litre, de 10 g de tryptone, de 5 g d'extrait de levure et de 10 g de NaCl. Le milieu a été ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 minutes pour être stérilisé.

2.3.Culture d'amibes

2.3.1. Milieu non axénique

La culture des amibes sur milieu solide a été réalisée sur gélose NNA-*coli* (*Non-Nutritive-Agar* + *E. coli*) composée seulement, pour un litre, de 15 g d'agar puis recouverte d'un tapis d'*E.coli* (dépôt d'environ 2 à 3.10^9 bactéries/gélose). Les températures d'incubation ont différé entre les différents

genres amibiens. Les amibes du genre *Hartmannella* ont été placées à 37°C, celles du genre *Naegleria* à 30°C et celles du genre *Acanthamoeba* à 25°C.

Les cultures non axéniques en milieu liquide ont été faites en tampon amibe supplémenté avec 5.10^8 *E. coli*/mL. Les flasques ont été mises à différentes températures selon le genre amibien (25°C pour les amibes du genre *Acanthamoeba*, 30°C pour celles du genre *Naegleria* et 37°C pour celles du genre *Hartmannella*) de 1 à 3 jours selon la concentration de l'inoculum utilisé.

2.3.2. Milieu axénique

Le passage en milieu liquide axénique des souches environnementales (du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria*) a été réalisé en déposant un carré de gélose découpé au niveau d'un front de migration d'une gélose NNA-*coli* dans une flasque de culture contenant du milieu 1034 additionné d'un cocktail d'antibiotiques (ampicilline, gentamycine et streptomycine à 200 µg/mL final chacun). Après croissance, les trophozoites ont été transférés dans une nouvelle flasque. Certaines souches d'amibes récalcitrantes à ce procédé, principalement des souches du genre *Naegleria*, ont été transférées en liquide dans la flasque en remplaçant le milieu 1034 par une suspension d'*E.coli* préalablement inactivées par la chaleur (15 minutes à 95°C).

La culture axénique en milieu liquide a été effectuée en flasque de 25 cm^2 ou 75 cm^2. Pour les amibes du genre *Naegleria* et *Acanthamoeba* la culture a été réalisée en milieu 1034 aux mêmes températures que la culture sur milieu solide. Ce milieu est composé, pour 1 litre, de 10 g de bacto-peptone, de 10 g d'extrait de levure, d'1 g d'ARN, de 15 mg d'acide folique, d'1 mg d'hémine et de 20 ml de tampon (10 g de Na_2HPO_4 et de 7,24 g de KH_2HPO_4 pour 400 ml de tampon). Le pH est ensuite ajusté à 6,5. Le milieu ainsi préparé est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes puis, complémenté en sérum SVF (Sérum de Veau Feotal) stérile pour une concentration finale de 10%. Les flasques ont été incubées à 25°C pendant 3 à 4 jours, jusqu'à obtention d'un tapis amibien. Le milieu a été renouvelé lorsque ce tapis était à confluence. La culture en milieu liquide des amibes du genre *Hartmannella* n'a pas été réalisée en milieu axénique.

3. Numération des micro-organismes (méthodes classiques de microbiologie)

3.1.Dénombrement des légionelles

3.1.1. Par densité optique

La concentration bactérienne d'une suspension peut être estimée par spectrophotométrie à 600 nm. Une densité optique (DO) égale à 1 correspond environ à une concentration de 10^9 bactéries cultivables/mL.

3.1.2. Par dénombrement des UFC

La méthode de référence pour le comptage des bactéries est le dénombrement des UFC. Pour ce faire, un échantillon de volume connu est déposé sur milieu gélosé et après incubation de la boîte (4 à 8 jours, 37°C pour *Legionella*), le nombre de colonies est compté. Celui-ci correspond au nombre de bactéries cultivables présentes dans l'échantillon.

La mesure des UFC a également été réalisée à l'aide d'un ensemenceur spiral (Whitley Automatic Spiral Plate, WASP, AES) pour les essais de co-culture. L'ensemenseur est équipé d'une seringue qui délivre un volume connu d'échantillon liquide dans une trajectoire spiralée sur une surface circulaire d'agar. Le stylet dépose des quantités décroissantes d'échantillon au fur et à mesure qu'il se déplace vers la périphérie de la gélose. Dans nos expériences, 2 boîtes ont été ensemencées avec 50 µL d'échantillon chacune. Après 5 jours d'incubation à 37°C, la concentration bactérienne a été déterminée par dénombrement des colonies (Figure 18). Pour se faire, une grille a été superposée et centrée sur la boîte de Petri à dénombrer. La concentration bactérienne a été déterminée en se référant à une table dans laquelle est répertoriée le nombre de colonies en fonction de la surface énumérée (Don Whitley Scientific Limited WASP 2 User Manual). Les limites de quantification ont été comprises entre 4.10^2 UFC/mL et 4.10^5 UFC/mL.

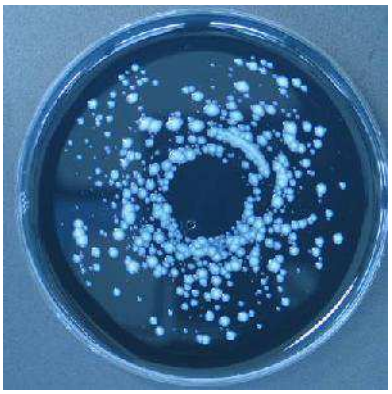


Figure 18 : Colonies de *L. pneumophila* après culture et ensemencement par l'ensemenceur spiral

3.2.Dénombrement des amibes

3.2.1. Dénombrement direct des amibes

La numération des amibes a été réalisée sur des cellules de comptages « Fast-read » (Bioblock). La cellule de comptage a été remplie avec 10 µL de suspension amibienne et observée au microscope inversé (Axiovert 40 CFL, ZEISS) à l'objectif X 10 ou X 40. La cellule Fast-read se compose d'une grille de 10 carrés et le volume d'un carré est équivalent à 0,1 µL. Le comptage a été réalisé dans 5 carrés différents. La moyenne des 5 comptages a permis de définir la concentration en amibes.

3.2.2. Méthode du nombre le plus probable (NPP)

La méthode NPP est une méthode statistique permettant d'estimer la concentration de microorganismes cultivables (bactéries ou amibes) dans un échantillon. Cette méthode a été utilisée lors des essais de désinfections sur les amibes, mais aussi pour dénombrer *Legionella* libres et intra-trophozoites lors de ces mêmes essais. Lors de cette étude, des volumes de 100 µL, 10 µL et 1 µL ont été déposés en triplicats (x 3) sur milieu gélosé spécifique du microorganisme recherché. Pour les amibes, un résultat positif se caractérise par l'apparition d'une plage de lyse due à la consommation du tapis bactérien sur gélose NNA-*coli*. Pour *Legionella*, un résultat positif se caractérise par la présence d'au moins une colonie bactérienne sur gélose BCYE. La combinaison des résultats positifs pour 3 dilutions (ex 3.3.1.) a été ensuite convertie en nombre de microorganismes dans l'échantillon de départ en se référant à des tables données par la littérature (US FDA/CFSAN appendix 2, Most Probable Number for serial dilutions, 2006, Annexe 4).

4. Co-culture

4.1.Co-culture en flasque

Les co-cultures en flasque ont été réalisées en introduisant dans une flasque de culture (25 cm^2) 5 mL de suspension à 10^6 amibes/mL en tampon amibe supplémenté avec 10% de milieu 1034, afin d'éviter l'enkystement des amibes. Puis un volume de 50 µL d'une suspension bactérienne à 10^7 bactéries/mL a été injecté (soit 10^5 bactéries/mL final) afin d'obtenir une MOI (rapport [bactéries]/[amibes]) de 0,1. Les flasques ont été incubées 24 à 48 heures à 30°C, pour obtenir des légionelles intra-amibiennes et 72h pour obtenir des légionelles post-amibes. Le tampon amibe est composé, pour 1 litre, d'1 g de citrate de sodium, de 10 mL de $MgS0_4$: 7 H_20 0,4M, de 10 mL de Na_2HPO_4 : $2H_2O$ 0,25M, de 8 mL de $CaCl_2$: $2H_2O$ 0,05M et 10 mL de KH_2PO_4 0,25M. Le pH est ensuite ajusté à 6,5 et le milieu

autoclavé à 121°C pendant 15 minutes puis 10 mL de$(NH_4)2FeII(SO_4)2$: 6H2O 5mM stérile (filtré sur 0,22 µm) sont ajoutés pour compléter le milieu.

4.2.Co-culture en microplaque

Les co-cultures en microplaques ont été préparées à partir des cultures d'amibes réalisées en milieu liquide non axénique (tampon amibe + 5.10^8 *E. coli*/mL. Un volume de 2 mL de tampon amibe supplémenté à 10% de SVF à une concentration de 3.10^5 amibes/mL a été introduit dans chaque puits après avoir collecté puis lavé les trophozoites. Les légionelles ont été ensuite ajoutées afin d'obtenir les MOI 0,1 et MOI 10. Les microplaques ainsi préparées (Figure 19) ont été placées à 25, 30 et 40°C. Un suivi des populations cultivables de *L. pneumophila* dans chaque puits a été réalisé à t0, t24, t48 et t72 heures. Les prélèvements dans les puits ont été effectués après remise en suspension des micro-organismes non adhérés par aspiration-refoulement d'un volume de 1 mL, action répétée 2 fois. Le prélèvement effectué a servi pour l'ensemencement. Les ensemencements ont été faits sur gélose GVPC à l'aide de l'ensemenceur spiral, WASP, après un traitement thermique de 30 minutes à 50°C afin d'inactiver les bactéries *E. coli* encore présentes lors de la co-culture. Les géloses ont été ensuite placées 4 à 5 jours à 37°C. Les essais ont été réalisés en triplicat.

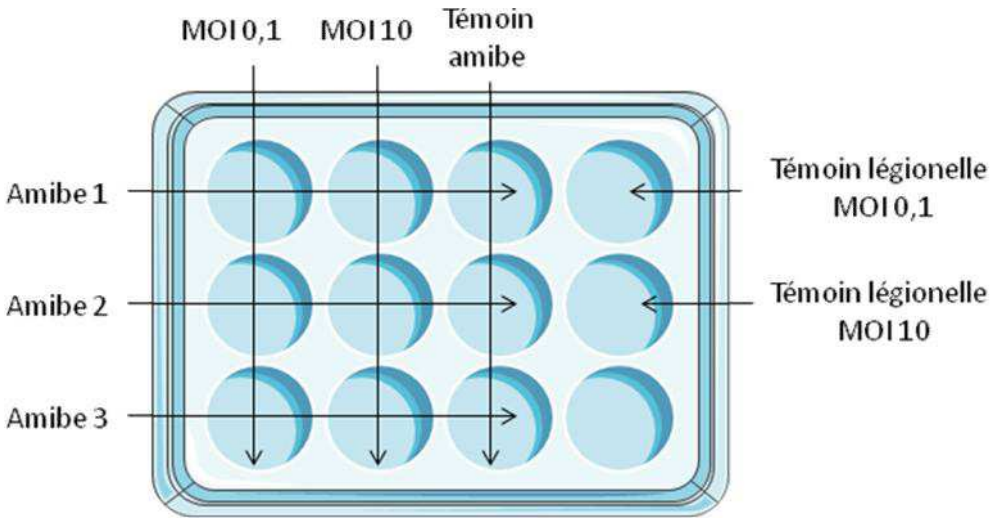


Figure 19 : Schéma d'une microplaque de co-culture

Pour chaque souche d'amibe, un puits témoin amibe a été préparé, des puits contenant des légionelles seules ont été également réalisés et dénombrés de la même façon que les puits de co-culture.

5. Séquençage

L'identification des souches amibiennes a été réalisée par séquençage d'une partie de l'ADN ribosomique 18S.

Pour ce faire, les amibes ont été collectées en grattant, à l'aide d'un grattoir, la surface des géloses NNA-*coli*, après s'être assuré visuellement d'un développement amibien sur la gélose. Une extraction d'ADN a été ensuite réalisée grâce au kit « Nucleo Spin Tissue » (Macherey-Nagel®). Une PCR a été effectuée à l'aide de la GoTaq Flexi DNA polymérase (Proméga®) sur ces extractions. Chaque mix de PCR était composé de 4 µL de tampon 5X, 1,6 µL de $MgCl_2$ à 25 mM, de 2 µL d'un mix de nucléotides à 10 mM chacun, de 0,1 µL de GoTaq polymérase, de 0,4 µL d'extraction d'ADN, de 2 µL, par amorce, à une concentration de 10 mM. Le volume a été complété à 20 µL à l'aide d'eau milliQ. Les amorces utilisées ont été les amorces Ami6 F1 et ami9 R (Thomas *et al.*, 2006) ; leur séquence est donnée dans l'Annexe 1. Le cycle PCR qui a été appliqué est le suivant : dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, puis 30 cycles d'amplification (94°C 30 secondes, 50°C 30 secondes, 72°C 1 minute) et enfin une étape d'élongation finale de 5 minutes à 72°C.

Après PCR et vérification de l'obtention des fragments des PCR via migration sur gel d'agarose, les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit « Nucleospin extract II » (Macherey-Nagel®). La réaction de séquençage a été ensuite réalisée. Pour ce faire, chaque mix de séquençage a été préparé de la manière suivante : 1 µL de Big Dye Terminator, 2 µL d'ADN purifié, 2 µL d'amorce, 2 µL de tampon 5X puis le volume a été porté à 10 µL à l'aide d'eau milliQ. Le cycle de séquençage a été constitué d'une étape de dénaturation de 1 minute à 96°C puis de 25 cycles d'amplification (96°C 10 secondes, 50 °C 5 secondes, 60°C 5 minutes).

Après amplification, l'ADN a été précipité. Pour ce faire, 3 volumes d'éthanol pur ont été ajoutés aux produits de séquençage puis mis à incuber à température ambiante pendant 15 minutes. Puis, les microtubes ont été centrifugés à 15000g pendant 15 minutes. Après centrifugation, l'éthanol a été ôté délicatement et les microtubes mis à évaporer à 37°C sur plaque chauffante jusqu'à obtention d'un culot sec. Pour finir, 20 µL de formamide ont été ajoutés et les échantillons ont été placées à -20°C et envoyés au séquençage.

Les séquences obtenues ont été ensuite comparées aux bases de données (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), afin de vérifier le genre amibien. Les séquences obtenues ont permis de s'assurer de l'identité des souches.

6. Identification et quantification par biologie moléculaire

6.1.Quantitative Polymérase Chain Reaction (PCRq)

6.1.1. Extraction d'ADN

Avant la réalisation de la PCR, l'ADN des cellules a été extrait à l'aide du kit d'extraction d'ADN « High Pure PCR Template Preparation Kit » (Roche®) en suivant les recommandations des fournisseurs. Ce kit permet l'extraction D'ADN à partir des trophozoites et des kystes amibiens. A la fin de l'extraction, l'ADN a été récupéré dans 200 µL de tampon et stocké à -20°C avant utilisation en PCRq.

6.1.2. Principe

La PCR en temps réel ou PCRq est basée sur le même principe que la PCR. Le but est d'amplifier une région d'ADN ciblée. La PCR se déroule en 3 étapes, qui à elles trois forment un cycle de PCR :

- la dénaturation à 95°C permet de séparer les doubles brins d'ADN.
- l'hybridation entre 55°C et 65°C, permet l'hybridation de l'amorce avec l'ADN matrice. La température varie en fonction de l'amorce utilisée.
- l'élongation à 72°C, température qui correspond au fonctionnement optimal de la Taq polymérase. Cette enzyme va synthétiser un brin complémentaire à partir du brin matrice.

La PCRq à la différence d'une PCR classique permet de quantifier l'ADN présent dans les différents échantillons grâce au SYBR green, une molécule qui s'intercale entre les deux brins d'ADN. Lorsque le SYBR est fixé, il émet une fluorescence à 530 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin. La mesure de la fluorescence au cours du temps permet d'obtenir une estimation de la quantité d'ADN présente dans l'échantillon. Une valeur de cycle seuil est aussi mesurée (Crossing Point ou Cp) et correspond au cycle de PCR à partir duquel la fluorescence émise est supérieure au bruit de fond. Cette valeur dépend de la quantité d'ADN présente, plus la quantité est grande, plus cette valeur sera faible. Ici, Les appareils utilisés, pour ces essais, ont été le thermocycleur LightCycler de Roche® 1.5 et le thermocycleur C1000 de Biorad®

6.1.3. Réalisation de la gamme étalon

Une gamme étalon a été réalisée afin de quantifier de manière absolue la quantité d'ADN en unité génome UG/µL grâce à une courbe étalon. Pour les amibes, elle a été réalisée avec les Cp de PCRq obtenues après des dilutions d'ADN d'*Acanthamoeba castelanii* souche *Neff* en concentrations

connues. Pour *Legionella*, la gamme étalon a été réalisée à partir d'une concentration en unité génomique *L. pneumophila* Lens déterminée par un calcul basé sur la masse de la taille du génome qui est de $3{,}9.10^6$ paires de bases. Ce calcul a été effectué après avoir préalablement quantifié l'ADN à l'aide du BioSpec-nano. La gamme étalon n'a été utilisée que lors des PCRq effectuées avec le thermocycleur LightCycler. Lors des PCRq réalisées avec le thermocycleur C1000, un kit commercial a été employé (kit IQ Check quanti *L. pneumophila*) contenant déjà des étalons internes et permettant au logiciel de déterminer directement les concentrations en *Legionella*.

6.1.4. Conditions expérimentales

Les séquences des amorces utilisées pour la PCRq sont données en Annexe 1.

Les réactions de PCRq ont été réalisées dans un volume final de 10 µL pour les réactions effectuées avec le thermocycleur LightCycler de Roche® 1.5. Le mélange réactionnel était composé de 2 µL d'ADN, des couples d'amorces à 0,5 µM chacune, et 5µL du mélange réactionnel de PCR quantitative, contenant la Taq polymérase, le SYBR green, le $MgCl_2$, et les dNTP (FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I, Roche®). Le volume a été ajusté à 10 µL à l'aide d'eau ultrapure.

Concernant les réactions de PCRq *Legionella* effectuées avec le thermocycleur C1000 de Biorad®, le volume final a été porté à 50 µL pour un mix composé de 5 µL d'ADN à quantifier, de 40 µL d'un mélange commercial contenant la Taq polymérase, le SYBR green, le $MgCl_2$, les dNTP ainsi que de 5 µL d'amorces. Pour les amibes, un volume réactionnel de 20 µL a été utilisé (volume minimal pour cette PCRq en puits) : 10 µL de « IQ SYBR supermix », 5 µL de l'ADN à quantifier, 1 µL d'amorces à 0,5 µM final chacune et 4 µL d'eau ultrapure composaient le mélange réactionnel.

Le programme de PCRq utilisé a différé selon le micro-organisme quantifié. Pour les amibes, le programme a été le suivant :

- 94°C pendant 10 minutes (activation de la Hot Start Polymerase)
- 45 cycles comprenant chacun : une étape de dénaturation de 10 secondes à 94°C, une étape d'hybridation à 62°C de 10 secondes, et une étape d'élongation à 72°C pendant 10 secondes.

A la fin des cycles, une courbe de fusion a permis de vérifier la spécificité des produits amplifiés : 95°C pendant 5 secondes, puis 65°C pendant 1 minute, suivi d'une élévation de la température de 65°C à 95°C, à raison d'une augmentation de 0,11°C par seconde pour le thermocycleur Lightcycler et 0,5°C par seconde pour le thermocycler C1000. La mesure de la fluorescence s'est faite 5 fois par augmentation d'un degré pour le thermocycleur Lightcycler et 2 fois par degré pour le thermocycler C1000. Les données ont été ensuite analysées soit grâce au programme LightCycler Software 3.5 (Roche®) soit grâce au programme CFX96 (Biorad®).

Le programme de PCRq utilisé pour les légionelles a été le suivant :

- 95°C pendant 10 minutes (activation de la Hot Start Polymerase)
- 45 cycles comprenant chacun : une étape de dénaturation de 10 secondes pour le thermocycleur Lightcycler, 15 secondes pour le thermocycler C1000 à 95°C, une étape d'hybridation à 60°C de 10 secondes pour le thermocycleur Lightcycler, 20 secondes pour le thermocycler C1000, et une étape d'élongation à 72°C pendant 10 secondes pour le thermocycleur Lightcycler, 30 secondes pour le thermocycler C1000.

Une courbe de fusion a été réalisée de la même façon que pour la quantification des amibes lors des PCRq effectuées avec le thermocycleur LightCycler de Roche® 1.5.

6.2.Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

Les solutions utilisées pour cette technique sont décrites dans l'Annexe 2

6.2.1. Principe

Cette technique consiste à réaliser une hybridation entre des sondes d'ADN (dans notre cas) marquées par un fluorochrome et un fragment spécifique d'ADN d'une cellule. Leur hybridation est visible à l'aide d'un microscope à épiflurorescence (ici, Olympus BX 41et Olympus BX 50). Les sondes sont dessinées pour être spécifiques d'un fragment de l'ADN de la cellule ciblée. Afin de réaliser cette hybridation, les cellules doivent, au préalable, être fixées puis rendues perméables pour permettre l'entrée de la sonde dans les cellules. Une étape de lavage complète le protocole et permet d'éliminer les sondes non hybridées et les hybridations non spécifiques.

6.2.2. Fixation des cellules

Les cellules (légionelles ou amibes) à fixer ont été mises en suspension dans 200 à 500 µL de tampon PBS (*Phosphate Buffer Solution*) 1X. Il a été ensuite ajouté trois volumes de PFA (Paraformaldéhyde) 3X, et le mélange a été placé à 4°C pendant 2 heures. La fixation au PFA permet de créer des ponts entre les protéines et de « figer » la cellule (Miething *et al.*, 2006). Les lipides ne sont pas solubilisés c'est pourquoi une étape de perméabilisation est ensuite nécessaire. Les échantillons fixés ont été ensuite lavés 3 fois avec du PBS 1X. Pour cela, les cellules ont été récupérées par centrifugation 8000g, 10 min pour les légionelles et 3000g, 15 minutes pour les trophozoites puis remises en suspension. Après ces trois lavages, les cellules ont été collectées et mises dans 200 µL d'un mélange PBS 1X/Ethanol 96% (v/v) puis placées à -20°C.

6.2.3. Réalisation de l'hybridation et montage des lames

L'hybridation a été réalisée sur des lames en verre de type polysine®. Après avoir dessiné des puits à l'aide d'un crayon gras, 2 à 10 µL de suspension de micro-organismes ont été déposés dans ces puits. Les dépôts ont ensuite été séchés à l'air libre sur la paillasse. En parallèle, le tampon d'hybridation a été préparé (ici tampon à 25% de formamide). Le tampon a été réalisé dans un microtube en ajoutant dans l'ordre suivant 360 µL de NaCl 5M, 40 µL de Tris HCl pH 8 1M, 500 µL de formamide, 1100 µL d'eau EUP stérile et 2 µL de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 10%. Le tampon ainsi préparé a été mis sur glace avant son utilisation.

Une fois les dépôts secs, une étape de déshydratation a été effectuée grâce à une série de 3 bains de 3 minutes chacun dans des solutions d'éthanol à concentration croissante (50% ; 80% et 96%). Après ces bains, l'excès d'éthanol sur les lames a été ôté. Une fois les lames sèches, la chambre humide a été préparée en plaçant une pièce de papier dans un tube de 50 mL afin de créer un support plat dans le tube sur lequel la lame a été posée.

L'hybridation a été réalisée avec différentes sondes (Annexe 1) selon les essais. Pour ce faire une goutte de 16 µL de tampon d'hybridation a été déposée sur chaque puits. Un volume de 4 µL de sondes a été ajouté au tampon d'hybridation, préalablement déposé, afin d'obtenir une concentration finale de chaque sonde de 5 ng/µL. Le reste du tampon d'hybridation a été versé sur la pièce de papier placée dans le tube pour réaliser la chambre humide. Les lames ont été déposées bien à plat sur cette pièce de papier. Le tube refermé a été incubé de 1h30 (sondes EUB 338, LEG 705 et LEGPNE1) à 2h (sondes Legall 11, Legall 22, Leg 705 et Leg 226) à 46°C, précisément, pour réaliser l'étape d'hybridation.

Le tampon de lavage a été ensuite préparé en ajoutant dans l'ordre suivant 1000 µL de Tris HCl pH 8 1M, 1490 µL de NaCl 5M, 500 µL d'EDTA pH 8, 0,5M. Le volume a été porté à 50 mL avec de l'eau EUP stérile et 50 µL de SDS 10% ont été ajoutés. Une fois ce tampon préparé, il a été placé à 48°C. Lorsque l'hybridation a été terminée, une étape de lavage a été effectuée pour éliminer l'excès de sondes et les hybridations non spécifiques. Pour cela, les lames sorties de la chambre d'hybridation ont été rincées en versant quelques mL de tampon de lavage puis elles ont été plongées dans le tampon de lavage pendant 15 minutes à 48°C. Après ce lavage, les lames ont été rincées avec de l'eau milliRO puis mises à sécher verticalement. Une fois sèches, 2 gouttes d'antifading Citiflour AF1 ont été déposées sur les lames (en dehors des puits) puis une lamelle a été ajoutée. Les lames ont été ensuite observées sous microscope à épifluorescence (Olympus BX 41et Olympus BX 50) à l'aide des filtres adéquats.

7. Méthodes de fixation

7.1.Fixation PFA et dérivés

Des essais de fixations de trophozoites ont été menés avec le PFA selon le même protocole que celui suivi lors de la méthode FISH. D'autres essais ont également été réalisés avec du PFA 5X avec des temps d'incubation de 10, 30 et 60 minutes.

Une autre fixation à l'aide d'un dérivé de formaldéhyde, le tampon formaline pH 7,4, a été testée. La solution a été préparée en mélangeant de 4 g/L de NaH_2PO_4, de 6,5 g/L de Na_2HPO_4, de 100 mL de formaline (38 à 40% de formaldéhyde) et de 900 mL d'eau (Nagerson and Peterson, 1980). La fixation a été appliquée sur une suspension de 200 µL de trophozoites à environ 1.10^6 amibes/mL. A cette solution, 3 volumes de solution de fixateur ont été ajoutés, le mélange a été mis à 4°C pendant 2 heures. Les cellules ont ensuite été lavées à l'aide de PBS 1X selon le même protocole que celui suivi pour la méthode FISH.

7.2.Fixateur à base de zinc

Une solution de fixation à base de zinc, dont la composition est décrite par Lykidis *et al.*, a été testée (Lykidis *et al.*, 2007). La solution été composée de 0,1 M tris-HCl pH 7,8, de 0,05% acétate de calcium, de 0,5% d'acétate de zinc et de 0,5% de chlorure de zinc. La fixation des cellules a été réalisée en mélangeant un volume d'une solution de trophozoites à une concentration d'environ 1.10^6 amibes/mL à 10 volumes de fixateur. Le tout a été placé à 4°C pendant une nuit. L'aspect des cellules, après fixation, a été observé par microscopie.

7.3.Solution de Carnoy

La solution de Carnoy est une solution à base d'alcool composé d'un mélange de 60% d'éthanol absolu, de 30% chloroforme, et de 10% acide acétique. Ce fixateur est utilisé en immuno-histochimie comme fixateur sur des coupes de tissus. La fixation des trophozoites, à l'aide de cette solution, a été testée en mélangeant 1 volume d'une solution de trophozoites à environ 1.10^6 amibes/mL à trois volumes de solution de Carnoy. La suspension a ensuite été placée à 4°C pendant 2 heures, et l'aspect des cellules, après fixation, a été observé par microscopie.

7.4.Fixation HOPE

La fixation par la méthode HOPE est une méthode commerciale basée sur une solution de protection contenant un tampon organique, et un agent déshydratant, l'acétone (Olert *et al.*, 2001). La fixation des trophozoites et des légionelles a consisté à ajouter 800 µL de la suspension de micro-organisme à fixer dans un tube contenant 4,2 mL de solution HOPE I. Le mélange a été ensuite placé à 4°C pendant 18 à 48 heures. Après cette étape, les cellules ont été collectées par centrifugation et 5 mL d'un mélange HOPE II/ acétone (100 µL de solution de HOPE II pour 100 mL d'acétone) ont été ajoutés, le tube a été ensuite placé sur glace pendant 2 heures. Après ces 2 heures et une fois les cellules récupérées par centrifugation, 3 lavages ont été effectués avec 5 mL d'acétone. Les tubes ont été mis sur glace pendant 2 heures entre chaque lavage. Finalement, les cellules ont été reprises dans 200 µL de tampon amibe, et l'ADN extrait puis quantifié par PCRq.

8. Méthodes de séparation

8.1.Solution de Percoll

Lors des filtrations en solution de Percoll, les cellules (légionelles et amibes) ont été préalablement culotées puis reprises dans 500 µL de PBS 1X ; 200 µL ont servis de témoin sans filtration et 200 µL ont été utilisés pour la filtration. Ces 200 µL ont été introduits dans 10 mL de solution de Percoll 20% puis ces 10 mL ont été filtrés sur membrane. La préparation de la solution de Percoll 20% a été réalisée en préparant d'abord une solution « 100% » de Percoll. Pour ce faire, 9/10 d'une solution de Percoll commerciale et 1/10 de PBS 10X ont été mélangés. La fraction 20% a été ensuite obtenue par dilution du mélange « 100% » avec la solution de PBS 10X.

8.2.Gradient de Percoll

Le principe de ce gradient est de séparer les micro-organismes par centrifugation grâce à la différence de densité de ces micro-organismes. Le Percoll est composé de particules de silicates coloïdales de 15 à 30 nm. D'après le manuel de méthodologie et d'application du Percoll, Biosciences, il est bien adapté à la mise en place de gradient de densité car il est peu visqueux, non toxique pour les cellules et possède une force ionique compatible avec les forces ioniques physiologiques.

Le protocole utilisé a été celui décrit par (Bracha *et al.*, 1982) puis complété par.(Avron *et al.*, 1983) pour la séparation des trophozoites et des kystes. Ce gradient a été préparé par dépôt successif des couches de différentes densités, à l'aide d'une pipette pasteur, en inclinant au maximum le tube pour éviter de mélanger les phases lors du dépôt. Les micro-organismes préalablement mis en suspension

dans du PBS 10X, 100 µL ont été ensuite déposés à la surface du gradient à l'aide d'une pipette. Les quantités d'amibes déposées ont été de 10^5 à 10^6. Pour les légionelles, les quantités déposées ont été de l'ordre de 10^8 à 10^{10}. Ces quantités de micro-organismes ont été concentrées dans un volume de 100 µL. Pour le gradient trophozoites/kystes, la centrifugation a été effectuée à 300g pendant 30 minutes avec une accélération et un frein réglé au minimum. Pour le gradient amibes/légionelles, le temps de centrifugation appliqué a été de 15 minutes à une vitesse de 2000g, avec une accélération et un frein réglé au minimum. Les différentes concentrations de Percoll utilisées pour les gradients sont décrites dans la Figure 20.

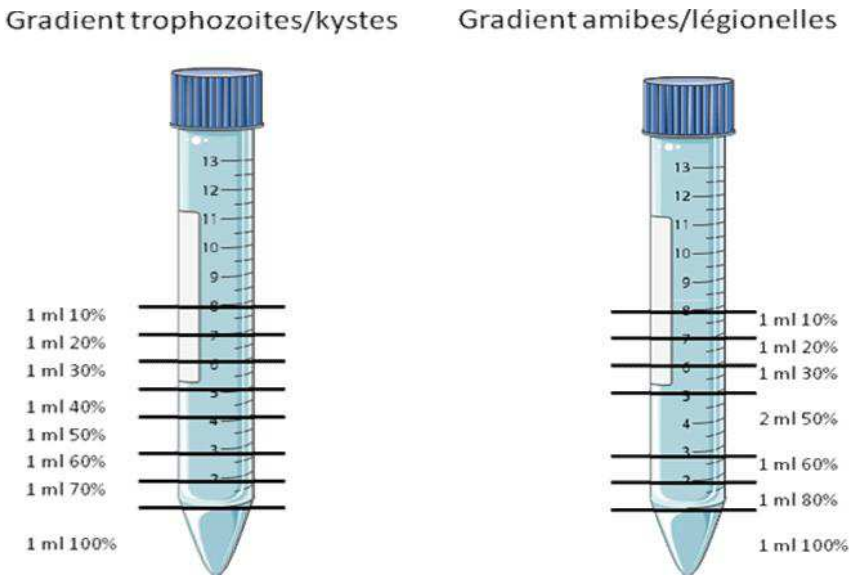


Figure 20 : Schéma des gradients de Percoll utilisés pour la séparation des micro-organismes

8.3. Immuno-capture des légionelles

8.3.1. Objectifs et principe

La méthode d'immuno-capture a pour but de récupérer les légionelles libres présentes dans un échantillon. Le principe de cette séparation est basé sur le couplage anticorps-antigène. Pour ce faire, des anticorps anti-légionelles sont greffés sur des billes magnétiques, puis ces anticorps se lient spécifiquement aux légionelles via leurs antigènes de surface. Les solutions utilisées pour cette méthode sont décrites dans l'Annexe 3.

8.3.2. Greffage des anticorps sur les billes magnétiques

Pour cette étape de greffage, des anticorps polyclonaux type IgG (AbD Serotec) ont été greffés sur des billes magnétiques (Dynabeads® M-280 Tosylactivated, Invitrogen). Les billes magnétiques ont été

remises en suspension dans le microtube commercial contenant ces billes et une solution. Le volume adéquat (ici 200 µL soit 6 mg de billes) a été transféré dans un microtube. Le surnageant a été ôté grâce à un portoir magnétique. Les billes ont été ensuite lavées avec 1 mL de tampon B, puis le surnageant a été ôté. Les anticorps (ici 30 µL à 4 mg/L) ont ensuite été déposés dans le microtube contenant les billes (ici 30 µL à 4 mg/L) et 108 µL de tampon B ont été aussi ajoutés portant le volume dans le microtube à 150 µL, les billes représentant un volume de 12 µL. 100 µL de tampon C ont été ensuite ajoutés et la solution homogénéisée par aspiration refoulement a été placée à 37°C sur la nuit (12-18 heures). Le lendemain, le surnageant a été ôté et les billes mises à incuber 1 heure à 37°C sous agitation avec le tampon D. Après l'heure d'incubation, le surnageant a été retiré et 1 mL de tampon E a été ajouté, le microtube a été ensuite vortexé 5 à 10 secondes. Cette étape a été répétée deux fois. Les tampons D et E correspondent à des tampons de lavage, utilisés afin d'éliminer les anticorps non fixés et de saturer les sites encore libres sur les billes grâce à la BSA (*Bovin Serum Albumine*). A la fin, les billes ont été resuspendues dans 250 µL de tampon E et stockées à 4°C avant utilisation.

8.3.3. Séparation des légionelles libres par immuno-capture

Des essais ont été menés avec *L. pneumophila* Lens mélangée avec une autre bactérie, *E. coli* dans du tampon amibe. Des tests ont également été réalisés avec des amibes du genre *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella* sous forme trophozoite et kyste afin de s'assurer de la spécificité de la méthode et vérifier l'absence d'adhésion des amibes aux billes. Les essais ont été réalisés en ajoutant 1 mL de suspension bactérienne, à la concentration de 1.10^7 bactéries/mL, à 50 µL de billes sur lesquelles les anticorps ont préalablement été greffés. Le microtube a été ensuite placé sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Après incubation, le surnageant a été ensemencé sur milieu BCYE et LB pour dénombrement. Les billes ont été également ensemencées, après lavage dans du tampon amibe afin d'éliminer le reliquat de surnageant. Pour les essais avec les amibes, 500 µL d'une suspension amibienne à 1.10^3 amibes/mL ont été ajoutés à 25 µL de billes. Après les essais, les billes et le surnageant ont été ensemencés sur gélose NNA-*coli* puis les amibes dénombrées grâce à la méthode NPP 3.

8.4.Filtration sur membrane

8.4.1. Sonication des échantillons avant filtration

Des billes en verre stériles de 5 mm de diamètre à raison de 5g pour 100 mL d'échantillon à traiter ont été ajoutées dans les échantillons avant filtration. Les échantillons ont ensuite été mis à agiter à 800 rpm, à l'aide d'un barreau aimanté. Puis 2 cycles constitués par 1 min de sonication à 40kHZ, 100%, 1 min d'agitation à 800 rpm ont été effectués.

8.4.2. Filtration sur membrane

Les filtrations sur membrane ont été effectuées à l'aide de membranes en acétate de cellulose de porosité de 3 et 5 µm. Les différents échantillons à filtrer ont été déposés dans une unité de filtration dans laquelle un filtre a, au préalable, été inséré. La filtration s'est effectuée grâce à une pompe à vide générant un vide de 7 à 13 kPa. Le filtrat ainsi que le filtre ont été ensuite récupérés pour dénombrer les micro-organismes par la méthode de PCRq.

9. Traitements chimiques

9.1.Tampon phosphate

Les traitements ont été réalisés dans un tampon phosphate. Ce tampon a permis la réalisation des traitements au pH souhaité, ici pH 8. Ce tampon présente l'avantage d'être non réactif avec les biocides testés et donc n'engendre de pas consommation du biocide. La composition de ce tampon pour un pH 8 et une concentration de 0,05 M est la suivante : K_2HPO_4 à $4.7.10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ et KH_2PO_4 à 3.10^{-3} $mol.L^{-1}$.

9.2.Préparation et dosage de la monochloramine

La monochloramine a été préparée en mélangeant dans de l'eau milli-RO, respectivement une solution d'ammoniaque (environ 3%) dans laquelle a été ajoutée au goutte à goutte et sous agitation une solution d'hypochlorite de sodium (environ 140 g/L). La solution ainsi préparée, a un pH de l'ordre de 8,3 et un rapport massique Cl_2/N de 4,8. La concentration visée de la solution mère préparée de cette façon a été de 1 g/L. La solution de monochloramine a été utilisée fraîche et n'a pas été conservée plus de 24 heures après sa fabrication. La mesure de la concentration en monochloramine est décrite dans la norme NF EN ISO 7393-2. Cette mesure est basée sur une méthode colorimétrique qui consiste à doser le chlore libre et total par spectrophotométrie (λ=510nm) après réaction avec la DPD (HACH Lange) oxydée par les halogènes en une mériquinone stable. Les concentrations en monochloramine sont exprimées en équivalent chlore en mg Cl_2/L.

9.3.Réalisation des désinfections

Les traitements ont été effectués en tampon phosphate pH 8 et en eau de rivière brute, filtrée et concentrée en MES sur des légionelles prélevées dans différentes phases physiologiques. 3 eaux de rivières ont été utilisées : de l'eau de la Vienne, de l'eau de la Moselle et de l'eau de la Loire.

9.3.1. Préparation des échantillons à traiter

Les *Legionella*, collectées à partir des cultures liquides ou des co-cultures ont été lavées 3 fois, à l'aide de tampon phosphate par 3 cycles de centrifugation 12 minutes, 4500g suivi d'une remise en suspension à l'aide d'un vortex.

Une fois les cellules lavées, elles ont été introduites dans un erlenmeyer contenant soit 100 mL de tampon phosphate, soit 100 mL d'eau de rivière brute, filtrée ou enrichie en MES. Ces cellules ont été introduites pour obtenir une concentration de 10^8 UFC/L dans l'erlenmeyer sauf pour les cellules issues de co-culture 24 ou 48 heures, où la prolifération dans les amibes n'a pas permis d'obtenir suffisamment de cellules pour se placer à une concentration de 10^8 bactéries/L. Les concentrations lors de ces traitements ont été comprises entre 10^6 et 10^8 UFC/L selon l'avancement de la prolifération dans les amibes. Pour les eaux de rivières, les cellules ont été mises en contact pendant une heure avant le début du traitement. Les eaux filtrées ont été obtenues en filtrant les eaux de rivière sur membrane d'acétate de cellulose de porosité 0,45 µm afin d'éliminer les MES. A contrario pour les eaux enrichies, 1 litre d'eau de rivière a été filtré, sur ces mêmes filtres, les MES collectées sur le filtre ont été ajoutées à 100 mL d'eau de rivière.

9.3.2. Réalisation des traitements

Les traitements ont été effectués en erlenmeyer dans 100 mL de tampon phosphate pH 8 ou d'eau de rivière à la température de 30°C. Des prélèvements microbiens ont été effectués à t0, t2, t8, t16 et t30 minutes pour les cellules en phase exponentielle et les co-cultures t24heures. Des prélèvements microbiens ont été effectués à t0, t16, t30, t45 et t60 minutes pour les cellules stationnaires et les co-cultures 48 heures. Pour les co-cultures t72 heures, les temps de prélèvements sont identiques à ceux précédemment cités à la différence près qu'un prélèvement supplémentaire a été ajouté à t75 minutes. Des témoins non traités ont également été faits à t0 ainsi qu'au dernier temps de prélèvement. La monochloramine, fraîchement préparée, a été introduite dans l'erlen après que le premier prélèvement microbien (t0) ait eu lieu. Des dosages, à l'aide de la DPD, de la concentration en monochloramine dans les erlens ont été effectués en parallèle des prélèvements microbiens et ce, pour les mêmes temps. Le biocide a été neutralisé dans les prélèvements microbiens par l'ajout de thiosulfate de sodium (10 µL à 0,01M). Les prélèvements microbiens ont été ensemencés sur gélose GVPC, 5 dilutions maximum ont été effectuées (de 1 mL 10^0, 100 µL à 10^0, 100 µL à 10^{-1}, 100 µL à 10^{-2}, 100 µL à 10^{-3}).

9.4.Calcul du Ct

Le Ct correspond à une exposition à un biocide, il est déterminé par le produit entre une concentration résiduelle en désinfectant et un temps de contact, il est exprimé en mg.min/L. Les valeurs de $Ct_{90\%}$ et de $Ct_{99,9\%}$ sont définies comme l'exposition nécessaire pour inactiver, respectivement, 1 et 3 unités logarithmiques de *Legionella*. Ces valeurs de Ct ont été déterminées, par calcul, à partir des résiduels de monochloramine mesurés lors des différents temps de prélèvements (identique à ceux des prélèvements microbiologiques) de chaque traitement et prennent donc en considération la demande éventuelle en monochloramine de la matrice.

Les calculs des $Ct_{90\%}$ et des $Ct_{99,9\%}$ ont été effectués en suivant l'équation suivante:

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kC^n t$$

N correspond à la concentration en *Legionella* après exposition au biocide, N_0 est la concentration initiale en *Legionella*, k est la constante de vitesse de désinfection en L/mg min, C est la concentration en biocide en mg/L, t est le temps (min) et n est le facteur de dilution (considéré comme égal à 1 dans le concept de Ct).

RESULTATS ET DISCUSSION

MULTIPLICATION INTRA-AMIBIENNE DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

L'objectif des co-cultures était de tester la capacité de souches d'amibes de circuits de refroidissement, appartenant aux genres amibiens les plus étudiés (*Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria*), à permettre la prolifération ou non de *L. pneumophila*. Parallèlement, il s'agissait de tester l'influence des paramètres températures et MOI sur la prolifération intra-amibienne de *L. pneumophila*. Préalablement, l'identification des amibes a été entreprise ainsi que la validation de la méthode de co-culture en microplaque.

1. Isolement et identification des souches amibiennes

Les 26 souches d'amibes (10 souches d'*Acanthamoeba*, 10 souches *d'Hartmannella* et 6 souches de *Naegleria*) fournies par EDF ont été isolées à partir d'échantillons d'eaux de circuits de refroidissement de centrales électriques alimentées par différentes rivières (Loire, Vienne, Rhône et Moselle), Tableau 7. Ces amibes ont été isolées sur gélose NNA-*coli* puis après repiquage et culture (25°C pour les amibes du genre *Acanthamoeba*, 30°C pour celles du genre *Naegleria* et 37°C pour celles du genre *Hartmannella*), les amibes ont été collectées en grattant la surface des géloses après les avoir humidifiées à l'aide de 2 mL de tampon amibe. L'ADN des amibes collectées a été ensuite extrait, amplifié avec des amorces spécifiques (ami6 F1 et ami9 R) de l'ARN 18S puis séquencé.

Seules 2 souches, sur les 26 reçues, Tableau 8, n'ont pas pu être séquencées pour une raison indéterminée, il s'agit des souches Ac 031 et Ac 234, toutes 2 appartenant théoriquement au genre *Acanthamoeba*. Une première détermination du genre par observation microscopique puis par PCR a été effectuée par l'industriel avant réception de ces souches. Sur ce tableau, la colonne du milieu, correspondant aux résultats de la recherche dans la base de données BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), indique la souche présente dans les bases de données pour laquelle la séquence du clone testé possède la plus grande homologie. La méthode utilisée laisse apparaître des séquences similaires entre plusieurs souches (Ht 113 et Ht 036 ; Ht 082, Ht 103 et Ht 187 pour les amibes du genre *Hartmannella*; Ng 161 et Ng 253 ; Ng 242 et Ng 247 pour le genre *Naegleria*). Ce résultat signifie soit que les souches sont identiques soit qu'il n'est pas possible de les discrimer par cette méthode. Les souches possédant une homologie de séquence sont encadrées d'une même couleur dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Identification par séquençage de l'ARN 18S des souches amibiennes

Genre	Nom de la souche	Résultat du BLAST en fonction de e-value	Commentaires
Acanthamoeba	Ac 095	Ac *sp.* Isolate U/Oft 1	Identique à Ac 120 ? (1 nucléotide de différence, nucléotide non sûr à 100%).
Acanthamoeba	Ac 116	Ac *sp.* T5-2 18s	
Acanthamoeba	Ac 073	Ac. *castellanii* 18s ribosomal RNA gene	
Acanthamoeba	Ac 137	Ac. *sp.* isolate U/Oft 1 small submit ribosomal unit	
Acanthamoeba	Ac 191	Ac. *sp.* aca VNAKO5 18s ribosomal RNA unit	
Acanthamoeba	Ac 120	Ac. *sp.* T5-2 18s	Identique à Ac 095 ? (1 nucléotide de différence, nucléotide non sûr à 100%).
Acanthamoeba	Ac 149	Ac. T5-1 18 ribosomal RNA gene	Mélange ?
Acanthamoeba	Ac 150	Ac. *sp.* T5-2 18s	Séquence proche de Ac 116
Acanthamoeba	Ac 031		Absence séquence
Acanthamoeba	Ac 234		Absence séquence
Hartmannella	Ht 008	*Hart. vermiformis* isolate KWR-1 18s	Doute sur 1 nucléotide
Hartmannella	Ht 251	*Hart. vermiformis* gene for 18s ribosomal RNA strain NHE (Hv)40-IR	
Hartmannella	Ht 188	*Hart. vermiformis* gene for 18s ribosomal RNA strain NHE (Hv)40-IR	Fort bruit de fond
Hartmannella	Ht 063	*Hart. vermiformis* gene for 18s ribosomal RNA strain NHE (Hv)40-IR	
Hartmannella	Ht 115	*Hart. vermiformis* 18 ribosomal RNA gene, partial sequence	
Hartmannella	Ht 113	*Hart. vermiformis* gene for 18s ribosomal RNA strain NHE (Hv)40-IR	Séquence identique à Ht 036
Hartmannella	Ht 036	*Hart. vermiformis* gene for 18s ribosomal RNA strain NHE (Hv)40-IR	Séquence identique à Ht 113
Hartmannella	Ht 187	*Hart. vermiformis* clone 4391 18s ribosomal RNA gene	Séquence identique à Ht 082 et Ht 103
Hartmannella	Ht 103	*Hart. vermiformis* clone 4391 18s ribosomal RNA gene	Séquence identique à Ht 082 et Ht 187
Hartmannella	Ht 082	*Hart. vermiformis* clone 4391 18s ribosomal RNA gene	Séquence identique à Ht 187 et Ht 103
Naegleria	Ng 117	*Nae. sp.* PB77	
Naegleria	Ng 135	*Nae. sp.* CRIB62	
Naegleria	Ng 161	*Nae. cf. gruberi*	Séquence identique à Ng 253
Naegleria	Ng 253	*Nae. cf. gruberi*	Séquence identique à Ng 161
Naegleria	Ng 242	*Nae. lovaniensis*	Séquence identique à Ng 247
Naegleria	Ng 247	*Nae. lovaniensis*	Séquence identique à Ng 242

Pour d'autres souches comme Ht 251, Ht 188 et Ht 063 appartenant au genre *Hartmannella*, les résultats du BLAST sont identiques mais la comparaison des séquences (non montrée) montre de légère différences (de un à quelques nucléotides). Enfin 2 souches du genre *Acanthamoeba* (Ac 149 et Ac 188) présentent des incertitudes dans leur séquence pour un ou plusieurs nucléotides. Ces incertitudes sont dues soit à une mauvaise résolution de séquençage, soit à un éventuel mélange de souches.

Ces résultats de séquençage ont abouti à la sélection de 12 souches (4 par genre) qui ne présentent ni ambiguïté de séquence ni aucune similarité de séquences avec une autre souche. Ces 12 souches (Ac 191, 116, 137 et 073 pour le genre *Acanthamoeba* ; Ng 117, 135, 161 et 242 pour le genre *Naegleria* ; Ht 113, 082, 063 et 251 pour le genre *Hartmannella*), présentées dans Tableau 7 ont été utilisées pour les essais de co-culture.

2. Choix et validation du protocole de co-culture en microplaque

2.1. Choix du protocole de co-culture

Plusieurs auteurs utilisent un protocole de co-culture consistant à mettre en contact légionelles et amibes, à de fortes MOI, minimum 10, mais pendant seulement une heure. Par exemple, Messi *et al.* utilisent une MOI de 10 et un temps de contact d'une heure pour infecter *A. polyphaga* avec des *L. pneumophila* appartenant à différents sérogroupes (Messi *et al.*, 2013). Les *Legionella* extracellulaires sont ensuite généralement tuées par ajout de gentamycine (50 à 100µg/mL) après en avoir éliminées un maximum par des étapes de lavages. D'autres auteurs vont même jusqu'à initier une intéraction physique entre légionelles et amibes en effectuant une centrifugation avant de resuspendre les cellules et de faire le suivi des concentrations en *Legionella* (Dey *et al.*, 2009). Cette option n'a pas été choisie pour nos essais. L'objectif n'était pas de favoriser l'entrée de *Legionella* dans les amibes, par l'utilisation de MOI élevée ou par une mise en contact artificiel via une centrifugation mais de tester la permissivité des amibes à *Legionella*.

Une simple mise en contact de *Legionella* et des amibes, comme dans notre cas, a permis à Greub et Raoult d'observer la morphologie de *L. pneumophila* dans *H. vermiformis* preuve que l'infection des amibes a bien eu lieu (Greub and Raoult, 2003). Rossier *et al*. ont réalisé des co-cultures, à MOI 0,1, entre *L. pneumophila* et *H. vermiformis* par simple ajout des *Legionella* dans une suspension d'amibes (Rossier *et al.*, 2009) comme ce fut le cas dans nos essais. De plus, Declerck et *al.*, décrivent un temps d'infection des amibes *A. castellanii* et *N. lovaniensis* par *L. pneumophila* de 90 minutes à l'aide d'une MOI de 10 (Declerck *et al.*, 2007). Au final l'absence d'enkystement en 24 heures comme le montre la Figure 24 est apparue comme un délai suffisant pour permettre une intéraction amibes/légionelles sans à avoir à réaliser de mise en contact par centrifugation.

Le protocole utilisé est décrit dans le paragraphe 4.2 du matériel et méthodes. Néanmoins, plusieurs points du protocole ont été vérifiés avant la réalisation des co-cultures en microplaque :

- Primo l'absence de prolifération des légionelles dans le milieu de co-culture ainsi que le maintien de leur cultivabilité sur 72 heures ; 3 souches de légionelles ont été testées : *L.*

pneumophila Lens, et 2 souches isolées de circuits de refroidissement de centrales électriques (*L. pneumophila* QEE 6945 et *L. pneumophila* QEE 4795).

- Secundo, l'absence de multiplication des amibes mais également l'absence d'un enkystement précoce qui aurait été préjudiciable pour la co-culture (seuls les trophozoites ingèrent les légionelles)
- Tertio, la méthode de prélèvement par aspiration-refoulement a été comparée à une autre méthode qui consistait à gratter les puits pour remettre en suspension les légionelles.

2.2.Témoin légionelles seules

La Figure 21 représente le suivi des concentrations en *L. pneumophila* Lens seules à 3 températures (25°C, 30°C et 40°C) et aux concentrations de 10^4 UFC/mL et 10^6 UFC/mL. Ces concentrations correspondent aux concentrations initiales en *Legionella* introduites pour les co-cultures avec les MOI respectives de 0,1 et 10 puisque lors de nos essais, ce sont les concentrations en *Legionella* qui ont été ajustées pour faire varier la MOI. Ces témoins *L. pneumophila* Lens seules montrent une stabilité des concentrations bactériennes après 3 jours dans le milieu de co-culture composé de tampon amibe supplémenté de 10% de SVF. Ces légionelles ne sont pas capables de proliférer dans ce milieu, en revanche elles conservent leur cultivabilité pendant au moins 72 heures soit la durée du test.

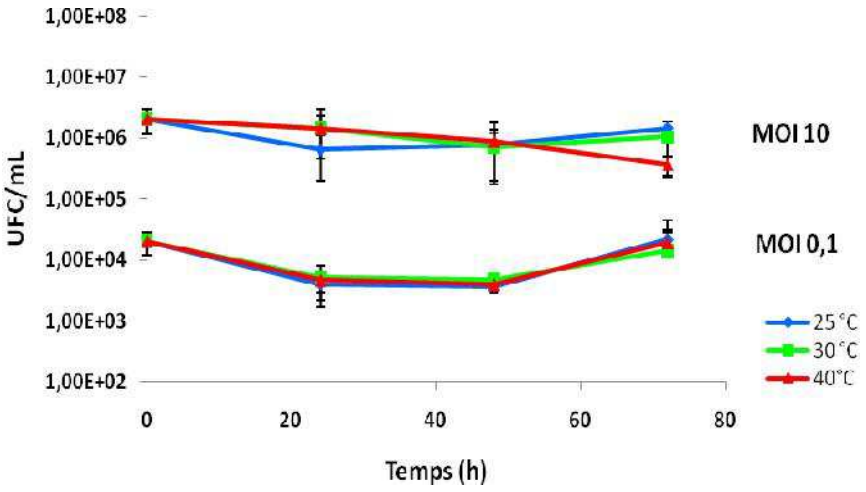


Figure 21 : Suivi de la cultivabilité, sur 72 heures, de *L. pneumophila* Lens (MOI 0,1 et MOI 10) dans le milieu de co-culture

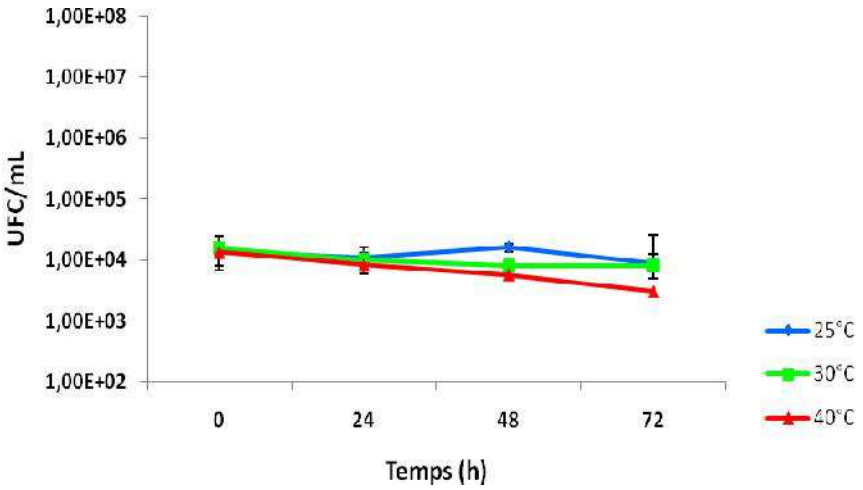


Figure 22 : Suivi de la cultivabilité, sur 72 heures, de *L. pneumophila* QEE6945 dans le milieu de co-culture

La Figure 22 présente le suivi des concentrations de la souche environnementale *L. pneumophila* QEE 6945 dans les puits témoins. Tout comme *L. pneumophila* Lens, ces témoins montrent une stabilité des concentrations de cette souche environnementale sur 72 heures.

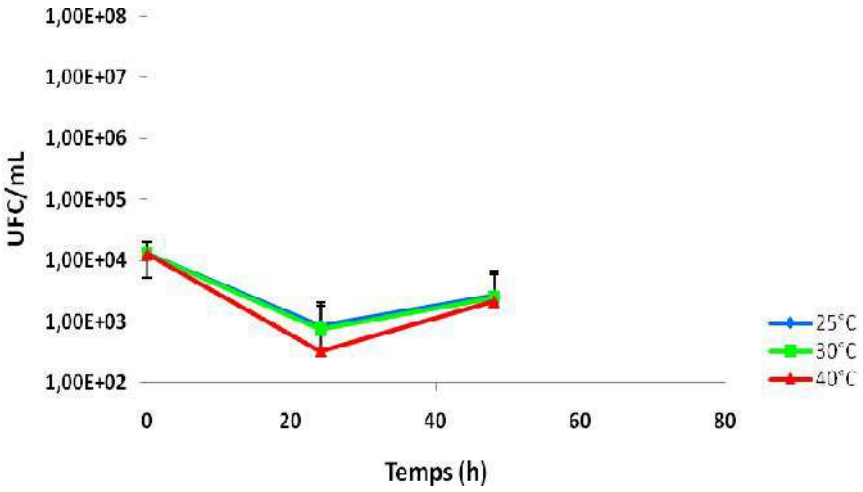


Figure 23 : Suivi de la cultivabilité, sur 72 heures, de *L. pneumophila* QEE4795 dans le milieu de co-culture

La Figure 23 représente le suivi des concentrations de la deuxième souche de *L. pneumophila* environnementale, celui de la souche QEE 4795. Les points à 72 heures, n'ont pas pu être représentés car les valeurs de dénombrement se sont avérées inférieures à la limite de détection à savoir 4.10^2 UFC/mL à 72 heures et ce pour les 3 températures (25°C, 30°C et 40°C). De plus, une perte de

cultivabilité a été constatée et ce, dès 24 heures. Cette souche n'a donc pas pu être utilisée lors des tests de co-culture.

Le suivi de la cultivabilité a montré que les souches de *L. pneumophila* Lens et QEE 6945 ne sont pas capables de proliférer dans ce milieu mais qu'elles conservent leur cultivabilité pendant au moins 72 heures soit la durée du test. Les tests de co-culture ont donc été effectués avec ces deux souches.

2.3.Témoin amibes seules

Tout comme pour *Legionella* des puits témoins pour les amibes ont été réalisés. Des prises de vue ont été faites pour suivre le comportement des amibes (multiplication ou non, enkystement ou non) dans le milieu de co-culture. Les amibes n'ayant pas pu être dénombrées comme pour le cas des bactéries. En effet, il ne nous a pas été possible de décoller l'ensemble des trophozoites adhérés aux puits. Les actions mécaniques ont entraîné une lyse d'une partie de ces amibes, l'utilisation de trypsine ainsi que la mise sur la glace des microplaques ne se sont pas avérées être des méthodes concluantes non plus.

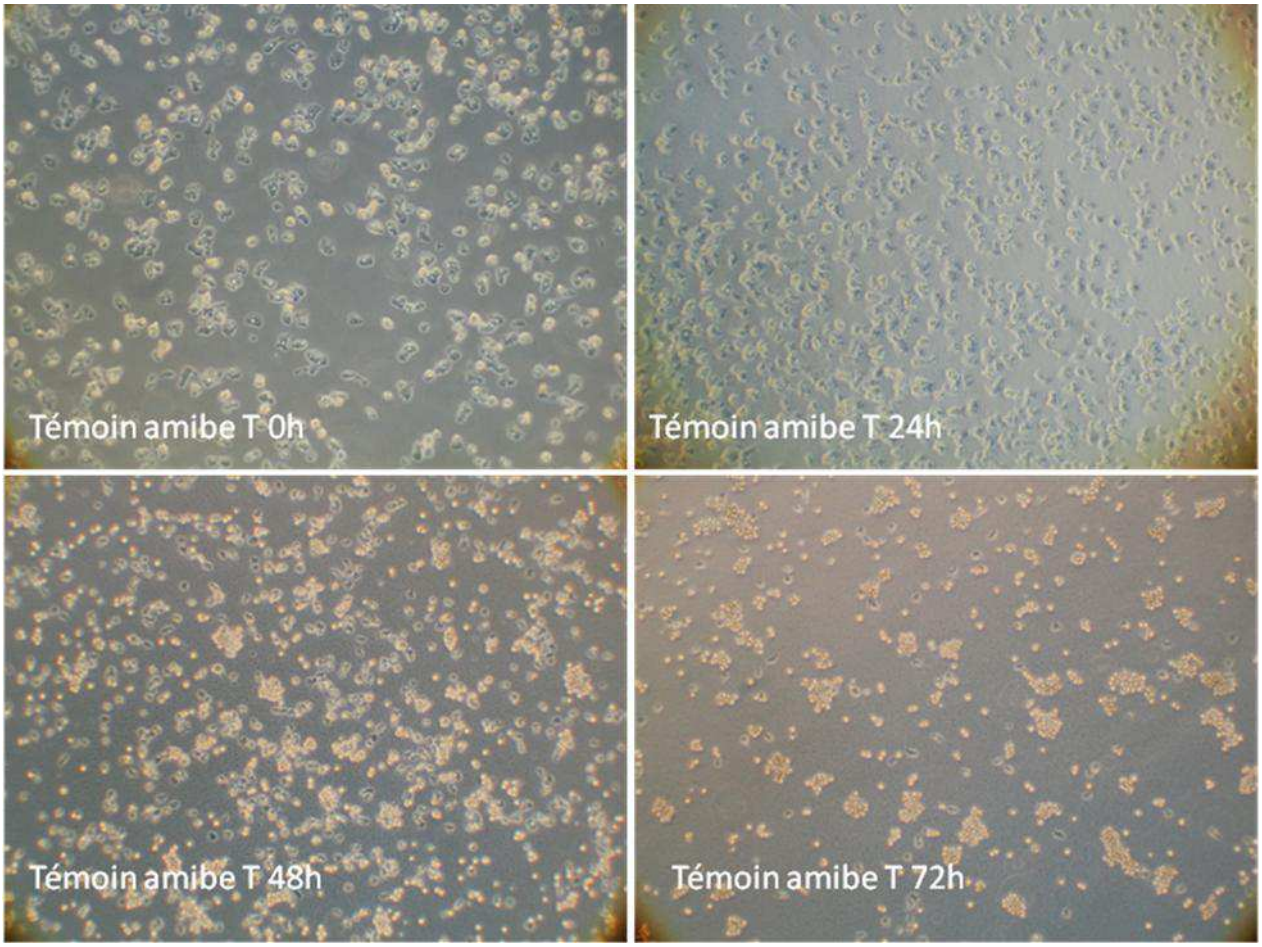


Figure 24 : Observation microscopique de la souche Ng 242 seule, dans le milieu de co-culure, à t0, t24, t48 et t72 heures (grossissement x160)

Les témoins amibes seules indiquent que les amibes ne prolifèrent pas dans le milieu de co-culture, Figure 24. La figure montre l'évolution dans le puits témoin de la souche Ng 242 pendant 3 jours à 40°C au grossissement 160. Il est observé un enkystement des amibes, à partir de 48 heures pour cette souche. Toutefois, la vitesse d'enkystement est variable d'une souche à l'autre et en fonction de la température d'incubation. Cependant aucun enkystement en 24 heures n'a été constaté quelle que soit la souche et la température d'incubation (25°C, 30°C et 40°C).

2.4. Validation de la méthode de prélèvements

Deux méthodes de prélèvements dans les puits ont été comparées : la première consistant à remettre en suspension les légionelles dans les puits par aspiration-refoulement **(méthode 1)** et la seconde méthode, plus intrusive pour l'échantillon, consistant à gratter les puits à l'aide d'une anse pour remettre en suspension amibes et légionelles **(méthode 2)**. L'objectif était, ici, de s'assurer que la remise en suspension par simple aspiration-refoulement était suffisante pour homogénéiser l'échantillon et permettait de bien représenter l'évolution des concentrations en *Legionella* dans les puits.

La Figure 25 présente la comparaison des deux méthodes de prélèvements lors d'un essai de co-culture, à MOI 0,1 à 30°C, réalisé sur 3 amibes (une par genre). D'après cette figure, ces 2 méthodes de prélèvements donnent des résultats identiques lors des dénombrements des légionelles.

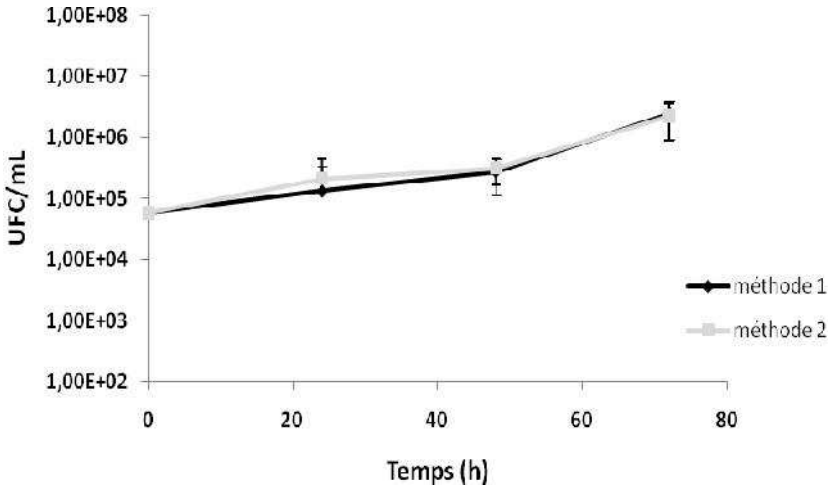


Figure 25 : Suivi de la concentration en *Legionnella* à l'aide des deux méthodes de prélèvements

La méthode de prélèvements choisie a été la méthode 1 car elle présente l'avantage de pouvoir suivre la prolifération des légionelles dans un même puits durant 72 heures à la différence de la méthode 2 qui consiste à gratter les puits avant de réaliser le prélèvement. Cette action mécanique entraîne la lyse

des trophozoites qui sont adhérés, et empêche la réalisation du suivi de la multiplication de *Legionella* dans un même puits durant 72 heures. L'utilisation de la méthode de prélèvement 2 aurait nécessité la multiplication des microplaques puisqu'un puits aurait été nécessaire pour chaque temps de prélèvement.

3. Co-cultures

Les co-cultures avec la souche *L. pneumophila* Lens ont été réalisées aux 3 températures choisies (25, 30 et 40°C), avec les MOI 0,1 et 10 et ce pour les 12 souches d'amibes sélectionnées, Tableau 7. Pour la co-culture avec la souche environnementale *L. pneumophila* QEE 6945, une sélection de 6 souches a été effectuée. Ces 6 souches d'amibes choisies ont été Ng 117, Ng 161, Ac 116, Ac 137, Ht 113 et Ht 063. Seule la MOI 0,1 a été testée pour cette souche, par contre les 3 températures ont été conservées. Les températures 25°C et 40°C ont été testées pour l'ensemble de ces 6 souches et la température 30°C a été testée pour une seule souche par genre.

3.1. Permissivité des souches d'amibes aux *L. pneumophila*

Dans le but de tester la permissivité des souches amibes, les co-cultures ont été réalisées à la MOI 0,1. Cette MOI avait montré qu'il était possible de multiplier *L. pneumophila* Lens dans des souches d'*Acanthamoeba* environnementales (Dupuy *et al.*, 2011). Les résultats sont présentés sous forme de figures pour l'ensemble des tests menés à la MOI de 0,1 puis une analyse statistique sur la comparaison inter-genre est présentée pour la souche *L. pneumophila* Lens. Les résultats des co-cultures avec la souche *L. pneumophila* Lens sont ensuite comparés à ceux obtenus avec l'autre souche de *Legionella* et, enfin, l'effet de la température et de la MOI est discuté.

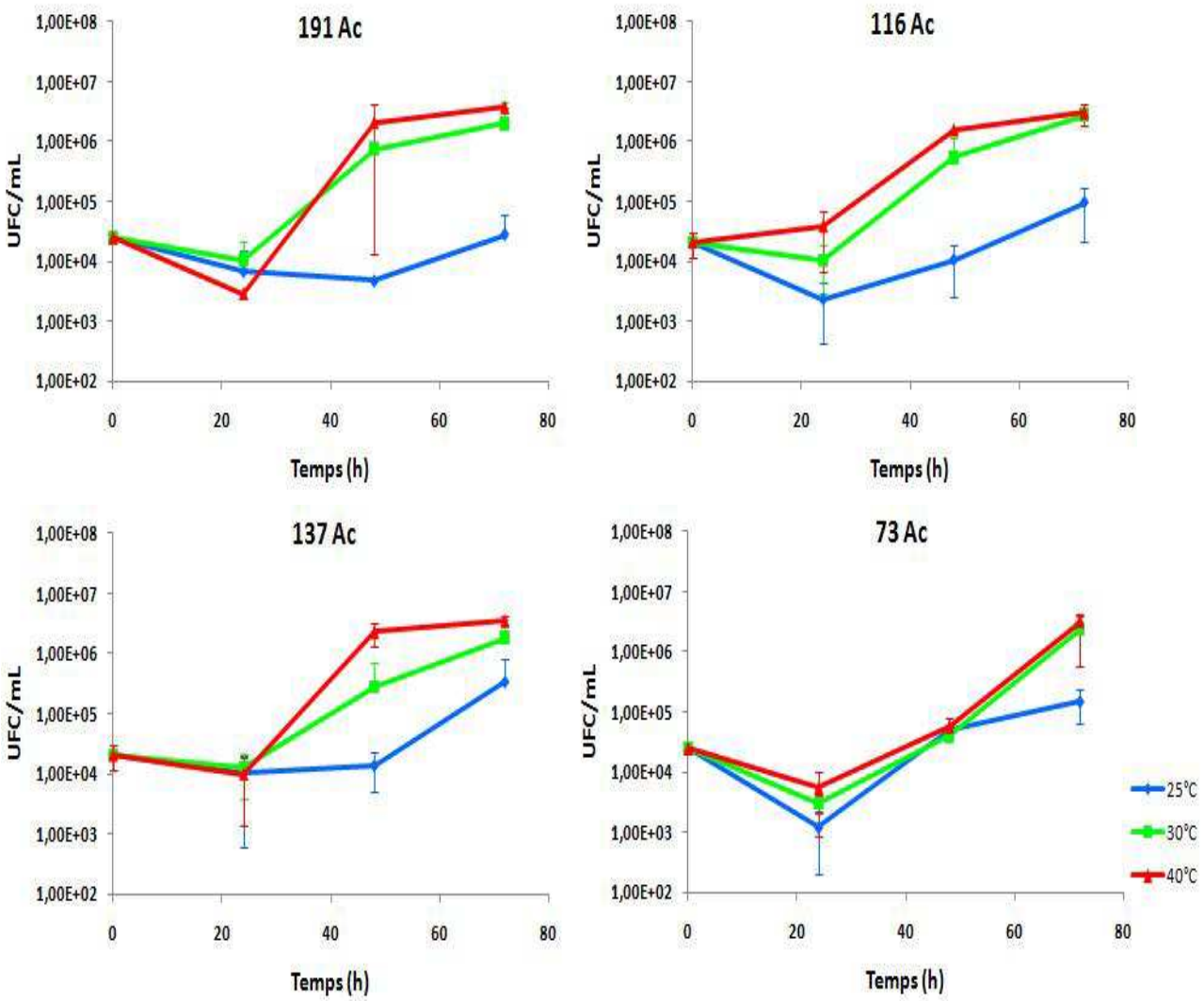


Figure 26 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de *L.p.* Lens en co-culture avec *Acanthamoeba* à la MOI 0,1

La Figure 26 montre que toutes les souches d'*Acanthamoeba* testées permettent la prolifération de *L. pneumophila* Lens. Peu de différences sont observées entre les différentes souches, néanmoins il semble que la souche Ac 073 permette une prolifération moins rapide (prolifération mesurée après 48h de co-culture) de *L. pneumophila* Lens que les autres souches d'*Acanthamoeba*.

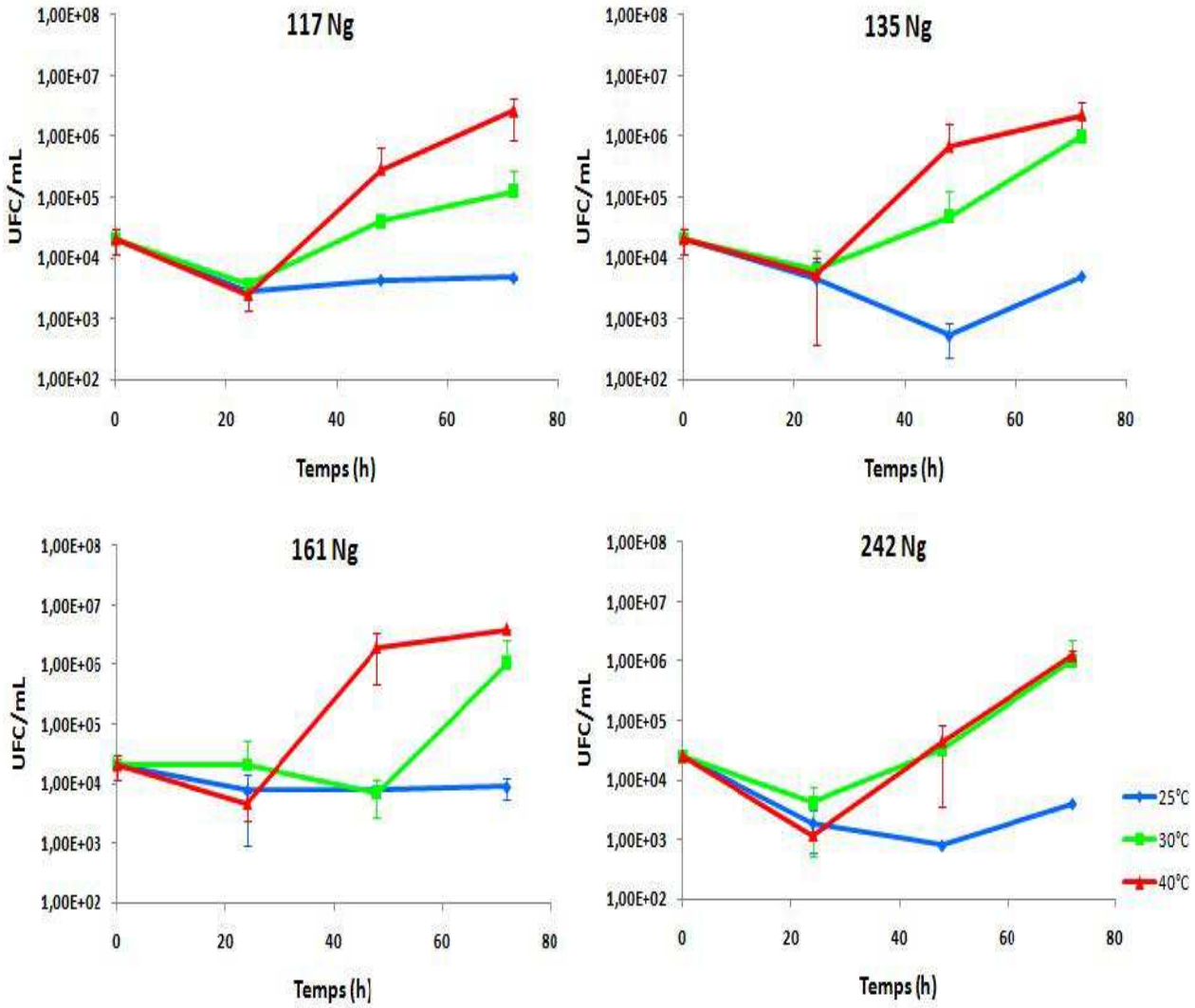


Figure 27 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de *L.p.* Lens en co-culture avec *Naegleria* à la MOI 0,1

Pour les amibes du genre *Naegleria*, le constat est identique que pour celles du genre *Acanthamoeba*, les 4 souches testées permettent la prolifération de *L. pneumophila* Lens, Figure 27. Parmi ces souches, la souche Ng 242 permet une prolifération moins rapide de *L. pneumophila* Lens qu'avec les autres souches notamment à 40°C (prolifération mesurée après 48 heures de co-culture).

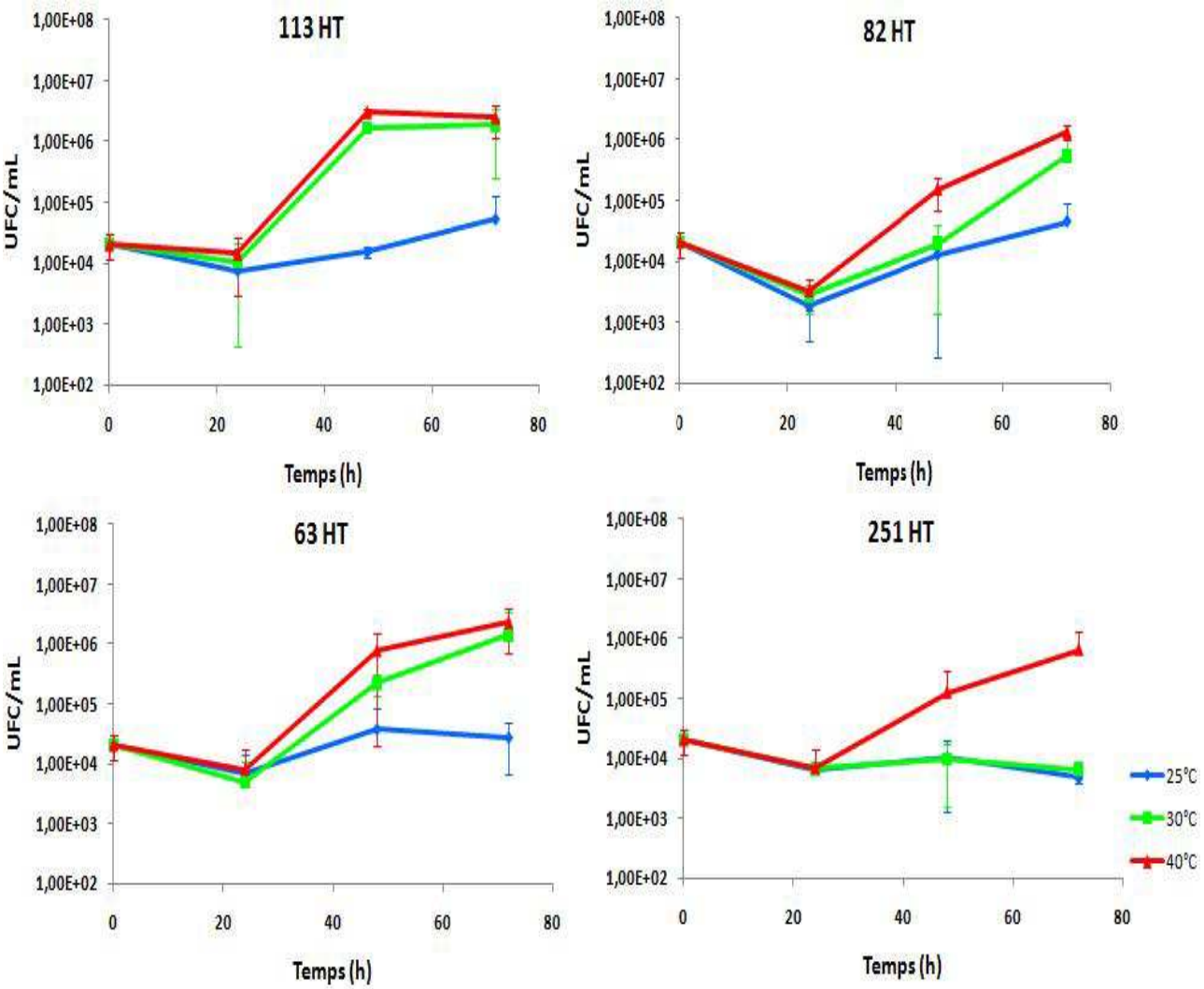


Figure 28 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de *L.p.* Lens en co-culture avec *Hartmannella* à la MOI 0,1

Pour les amibes du genre *Hartmannella*, les résultats sont identiques aux autres genres amibiens. Toutes les souches testées sont permissives à *L. pneumophila* Lens, Figure 28. Autre observation, les souches, Ht 082 et Ht 251 permettent une prolifération de *L. pneumophila* Lens moins rapide qu'avec les souches Ht 113 et Ht 063.

L'ensemble des souches d'amibes testées s'est montré permissive à *L. pneumophila* Lens. Quelques différences dans la vitesse de prolifération ont pu être observées entre des souches appartenant à un même genre. Dans le but de déterminer si le genre amibien a un impact sur la prolifération de *L. pneumophila* Lens, les concentrations en *Legionella* ont été comparées à l'aide de tests de Wilcoxon puisque la distribution des résultats ne suit pas une loi normale, le test de Student ne peut être appliqué. Les comparaisons ont été faites entre chaque genre, pour les 3 températures et aux 3 temps, Tableau 9.

Tableau 9 : Comparaison statistique de la multiplication de *L.pneumophila* Lens en fonction du genre amibien

Type de comparaison	**Température**	**t24h***	**T48h***	**T72h***
			p values	
Acanthamoeba/Naegleria	25°C	0,855	0,371	0,100
Acanthamoeba/Hartmannella	25°C	0,855	0,625	0,201
Naegleria/Hartmannella	25°C	0,855	0,371	0,100
Acanthamoeba/Naegleria	30°C	1,000	0,100	0,100
Acanthamoeba/Hartmannella	30°C	0,584	0,855	0,100
Naegleria/Hartmannella	30°C	0,855	0,584	1,000
Acanthamoeba/Naegleria	40°C	0,100	0,100	0,201
Acanthamoeba/Hartmannella	40°C	0,855	0,584	0,100
Naegleria/Hartmannella	40°C	0,100	0,361	0,361

***Valeurs des *p values*, test de wilcoxon signé au niveau de signification 5%**

La comparaison des concentrations de *L. pneumophila* dans les 3 genres amibiens, lors des différents temps de co-culture, ne montre pas de différences significatives quelque soit la condition observée. Les valeurs des *p values* sont toutes supérieures à 0,05. Tableau 9. Néanmoins, dans plusieurs cas, les *p values* sont égales à 0,1 ce qui indique qu'il y a environ 90% de chance que l'hypothèse d'une absence de différence de concentrations en *L. pneumophila* Lens, après multiplication dans ces genres amibiens soit fausse. Ce sont les comparaisons du genre *Acanthamoeba* où les valeurs de *p values* égales à 0,1 sont le plus souvent retrouvées.

Lors d'une étude menée par Chang *et al.*, après 48 heures à 37°C, les concentrations en *L. pneumophila* étaient significativement plus importantes pour des co-cultures réalisées avec *Acanthamoeba* qu'avec *Hartmannella* (Chang *et al.*, 2009). Dans notre cas, il n'y a pas de différence significative après 48 heures, néanmoins les comparaisons à t72h des concentrations en *Legionella* après prolifération dans les amibes du genre *Acanthamoeba* et *Hartmannella*, à 30°C et 40°C sont proches du seuil de significativité (*p value*, test de wilcoxon égal à 0,1) ainsi que celles entre les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria*, à 25°C et 30°C. Le mode de co-culture différent pourrait expliquer ce décalage dans le temps entre 48 et 72 heures, puisque dans leur cas, les *Legionella* ont été mises en contact deux heures à MOI 500 pour faciliter leur entrée dans les amibes, puis les *Legionella* extracellulaires ont été retirées par centrifugation. La prolifération a donc peut-être été initiée plus vite qu'avec notre protocole où il n'y a pas d'étape d'intéraction de ce genre ce qui pourrait expliquer

pourquoi à 48 heures, ces auteurs obtiennent une différence significative alors que dans notre cas c'est seulement à 72 heures qu'une tendance apparaît.

Il faut également noter que lors de leur étude ces auteurs n'ont testé qu'une seule souche d'amibes par genre, la différence inter-genre observée n'est peut-être qu'une différence inter-souche. Dans notre cas, les proliférations de *L. pneumophila* Lens apparaissent similaires avec les différentes amibes testées que ce soit pour le genre *Acanthamoeba* ou *Hartmannella*, Figure 26 et Figure 28. D'après d'autres auteurs, les amibes du genre *Acanthamoeba* permettent une prolifération un peu plus importante de *L. pneumophila* Paris, que celles du genre *Hartmannella* (2,3 log et 2,6 log, respectivement, après 3 jours de co-culture à 37°C) (Dey *et al.*, 2009). Concernant les amibes du genre *Naegleria*, Declerck *et al.*, indiquent lors de leur étude qu'après 72 heures de co-cultures à la MOI de 0,1, identique à la notre, la prolifération de *L. pneumophila* est d'1 log avec *N. lovaniensis* et de 4 log avec *A. castellanii* (Declerck *et al.*, 2005). Pour ces auteurs, le genre amibien a un effet sur la prolifération de *L. pneumophila* ce qui ne semble pas le cas dans notre étude puisqu'il n'existe aucune différence significative lors de la comparaison inter-genre, Tableau 9. Au final, dans nos conditions d'essais et avec les souches amibiennes testées, la prolifération de *L. pneumophila* Lens a été possible dans les 12 souches d'amibes testées et cette multiplication n'est pas apparue significativement dépendante du genre mais une tendance est tout de même visible à 72 heures pour les amibes du genre *Acanthamoeba*. De plus, les données de la littérature ne sont pas suffisantes pour trancher cette question même si les amibes du genre *Acanthamoeba* pourraient permettre une prolifération de *Legionella* plus importante d'après les résultats de certaines publications.

Pour la co-culture avec la souche de *L. pneumophila* environnementale QEE 6945, 6 souches d'amibes ont été choisies (Ng 117, Ng 161, Ac 116, Ac 137, Ht 113 et Ht 063). Seule la MOI 0,1 a été testée, par contre les 3 températures ont été conservées. Les proliférations avec les 2 souches de *Legionella* sont représentées sur le même graphique pour faciliter la comparaison, Figure 29.

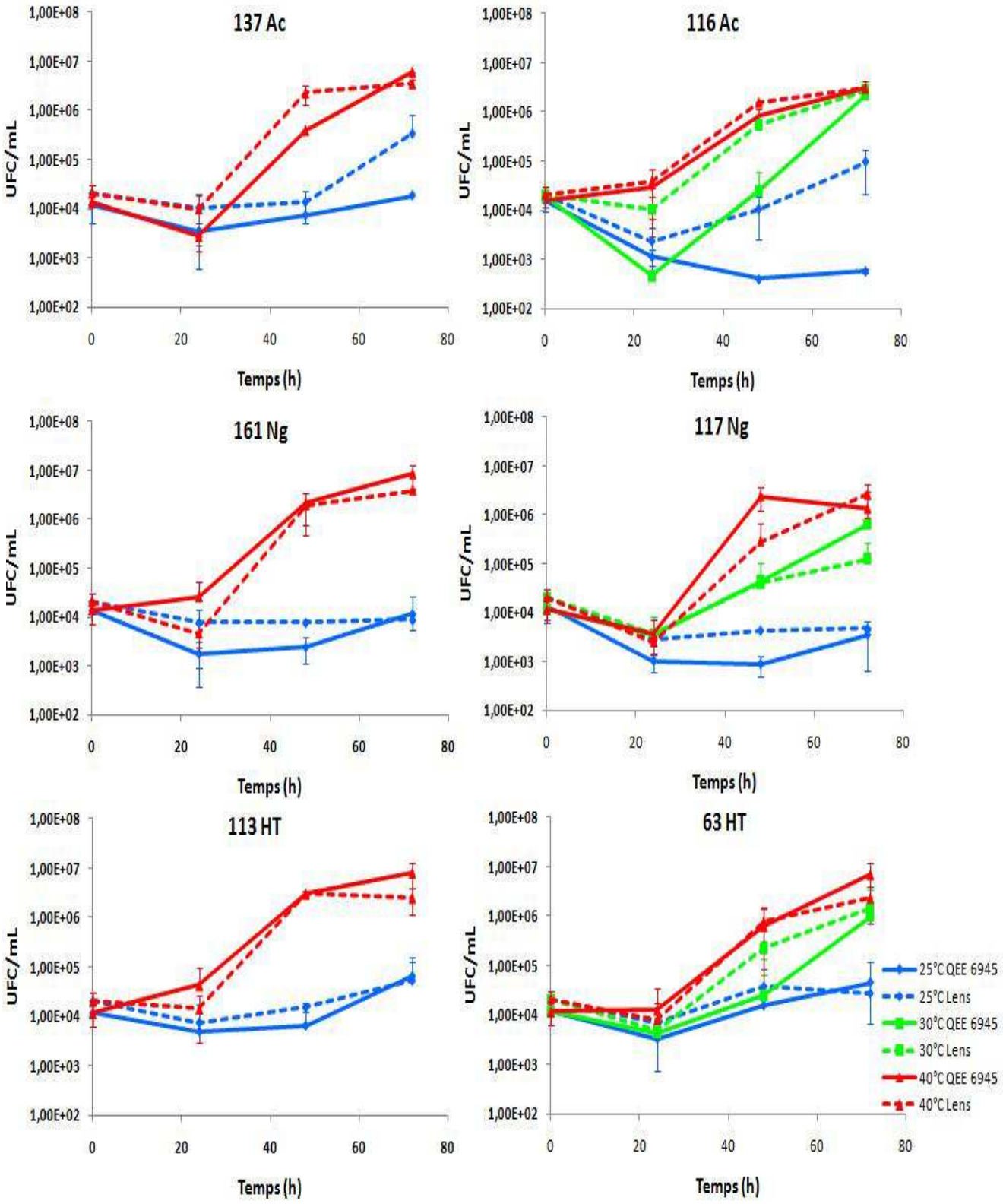


Figure 29 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de *L.p.* Lens et *L.p.* QEE 6945 en co-culture avec les amibes (MOI 0,1)

D'une manière générale, les essais menés avec la souche environnementale *L. pneumophila* QEE 6945, montrent des résultats comparables à ceux obtenus avec la souche *L. pneumophila* Lens, Figure

29, mis à part lors de la co-culture avec la souche Ac 116. Toutes les souches d'amibes testées permettent la prolifération de cette souche de légionelle. Lors de la co-culture avec la souche d'amibe Ac 116, la souche environnementale de légionelle QEE 6945 présente un retard de prolifération comparée à la souche Lens à 30°C et une diminution de sa concentration à 25°C.

Les deux souches de *L. pneumophila* se sont donc avérées capables de proliférer dans toutes les souches d'amibes testées indépendamment du genre. Dans la littérature, Buse et Ashbolt ont montré que certaines souches de *L. pneumophila* appartenant à plusieurs sérogroupes (1, 3, 5 et 6) ne sont pas capables de proliférer dans tous les genres amibiens (Buse and Ashbolt, 2011). Lors de leur étude, ils ont testé, en co-culture, 5 souches de légionelles (3 issues d'isolats cliniques et 3 d'isolats environnementaux) avec 3 souches d'amibes (2 souches d'isolats cliniques et 1 d'isolat environnemental). Les souches d'amibes appartenaient aux mêmes trois genres différents que dans notre étude (*Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria*). Selon ces auteurs, le couple hôte-pathogène ainsi que le facteur température sont importants pour la prolifération de *Legionella*. En effet, lors de leur étude aucune souche de *Legionella* n'a été capable de se multiplier dans toutes les amibes et aucune amibe n'a permis la prolifération de toutes les souches de *Legionella* pour des tests menés à des températures identiques.

Une autre étude menée par Wadowsky *et al.*, dans laquelle la prolifération de 19 souches de légionelles de différents sérogroupes a été testée en co-culture avec une souche d'*Hartmannella vermiformis*, a montré que seules douze des souches de légionelles ont été capables de se multiplier d'un facteur de 0,6 à 3,5 log (Wadowsky *et al.*, 1991). Dans leur étude, la MOI était de 0,4 et la température des co-culture de 37°C. Pour ces auteurs, les différences observées pourraient être dues à des facteurs de virulence absents pour certaines souches ce qui expliquerait l'absence de prolifération pour ces souches. Plus récemment, Messi *et al.*, ont comparé la prolifération de *L. pneumophila* appartenant à différents sérogroupes (1, 6, 9) avec l'amibe *A. polyphaga* (Messi *et al.*, 2013). La souche de *L. pneumophila* appartenant au sérogroupe 1 s'est le plus multipliée (2 log après 72 heures), la souche du sérogroupe 6 a proliféré d'1 log et celle du sérogroupe 9 ne s'est que très peu multipliée. La virulence de la souche de *Legionella* pourrait être liée à sa capacité à proliférer au sein des amibes et aussi à sa cytophatogénicité c'est-à-dire à sa capacité à lyser la cellule hôte (Messi *et al.*, 2013). Lors de nos essais nous avons seulement suivi la prolifération des *L. pneumophila.* Aucun test de cytophtogénicité n'a été réalisé. Par contre les deux souches que nous avons testées appartiennent au sérogroupe 1. De plus, la souche Lens est une souche épidémique. Le fait d'avoir utilisé une souche virulente (Lens) ou tout du moins appartenant au sérogroupe 1 (QEE 6945), le plus souvent incriminé dans les cas de légionellose, pourrait peut-être expliquer qu'elles aient réussi à proliférer dans toutes les souches d'amibes testées, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature comme ce fut le cas dans l'étude de Buse *et al.*, (Buse and Ashbolt, 2011). Il n'en reste pas moins que ces essais sont les

premiers qui décrivent la multiplication de *L. pneumophila* appartenant au sérogroupe 1 dans un panel de souches amibiennes aussi large.

Une autre observation valable pour l'ensemble des souches est que lors de nos essais à MOI 0,1, la multiplication des légionelles a été limitée à environ 2 log. Cet effet de plateau a été observé par d'autres auteurs, comme par exemple par Wadowsky et *al*, où après trois jours de co-culture, la concentration en légionelles a plafonné (Wadowsky *et al.*, 1991). Dans leur cas, la prolifération maximale obtenue était de 3 log. Des observations microscopiques nous ont montré qu'après 3 jours de co-cultures, il ne restait que peu de trophozoites dans le milieu à 40°C, ce qui laisserait penser que la multiplication des légionelles est simplement stoppée car il n'y a plus de cellules hôtes dans le milieu. Par contre à 25°C, des trophozoites sont encore présents dans le milieu, témoignant du fait que la multiplication des légionelles a été limitée, Figure 30.

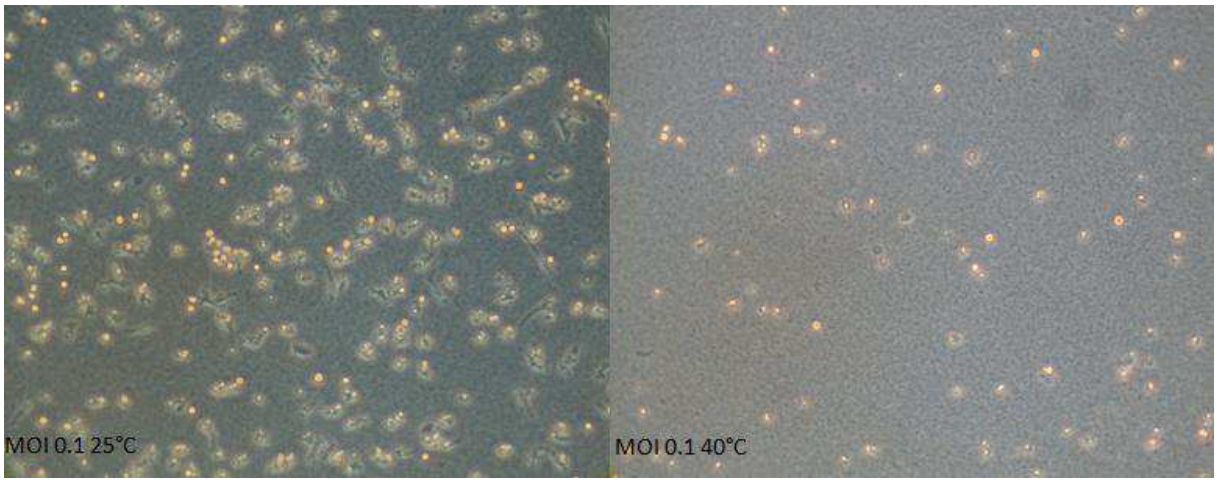


Figure 30 : Aspect de la souche Ht 113 dans le puits de co-culture, à 25°C et 40°C, après 72 heures (grossissement x160)

3.2.Effet de la température

Le choix des températures à tester, à savoir 25°C, 30°C et 40°C a été fait pour être représentatif des températures rencontrées en circuits de refroidissement selon le compartiment (branche chaude et bassin froid) et la période de l'année. Afin de comparer l'effet de la température, une analyse statistique a été réalisée grâce au test de Wilcoxon puisque la distribution des résultats ne suit pas une loi normale. Les comparaisons ont été faites pour les 3 températures et aux 3 temps, Tableau 10.

Tableau 10 : Comparaison statistique de la multiplication de *L.p.* Lens en fonction de la température

Type de comparaison	Genre	t24h*	T48h*	T72h*
			p values	
25°C/30°C	*Acanthamoeba*	0,100	0,201	0,100
30°C/40°C	*Acanthamoeba*	1,000	0,100	0,100
25°C/40°C	*Acanthamoeba*	0,584	0,100	0,100
25°C/30°C	*Naegleria*	0,361	0,371	0,100
30°C/40°C	*Naegleria*	0,100	0,100	0,100
25°C/40°C	*Naegleria*	0,201	0,371	0,100
25°C/30°C	*Hartmannella*	0,584	0,201	0,125
30°C/40°C	*Hartmannella*	0,100	0,100	0,125
25°C/40°C	*Hartmannella*	0,100	0,100	0,100

***Valeurs des *p values*, test de wilcoxon signé au niveau de la signification 5%**

L'effet de la température est visible sur l'ensemble des figures présentant les résultats de co-cultures (Figure 26, Figure 27 et Figure 28). Pour l'ensemble des souches de légionelles et d'amibes testées, la prolifération est maximale à la température de 40°C. En revanche à 25°C, on note soit une augmentation des concentrations d'1 log à partir de 72 heures, soit une absence de prolifération voire une diminution des concentrations. A 30°C, le comportement est plus difficile à appréhender, plusieurs cas de figures se présentent : une absence de prolifération (251 HT), un retard dans la multiplication par rapport aux proliférations à 40°C (137 Ac, 117 Ng, 135 Ng, 161 Ng et 82 HT) ou bien encore une prolifération sensiblement identique a ce qui se passe à 40°C (191 Ac, 116 Ac, 73 Ac, 242 Ng, 113 HT et 63 HT).

D'après le Tableau 10, bien qu'aucune valeur de *p values* ne soit inférieure à 0,05, pour les comparaisons entre 25 et 40°C après 72 heures, les *p values* (égales à 0,1) sont proches du seuil de significativité et ceux pour les trois genres amibiens testés. Ceci tend à montrer une tendance concernant un effet de la température après 72 heures de co-culture. D'autres comparaisons présentent de valeurs de *p values* égales à 0,1 mais il est plus délicat d'en tirer une tendance globale pour les trois genres. Au final, d'après le Tableau 10, il semblerait que la multiplication de *Legionella* soit dépendante de la température. De plus, à la lecture de la Figure 26, de la Figure 27 et de la Figure 28, la température 40°C semble favoriser la prolifération.

Cet effet de la température a déjà été observé par Ohno *et al.* (Ohno *et al.*, 2008). Ces auteurs ont comparé les résultats de co-culture entre une souche de *L.p.* et la souche d'*Acanthamoeba* ATCC

30 234 à trois températures (15°C, 20°C et 25°C). Leurs résultats indiquent un effet de la température, avec dans leur cas, une décroissance de la population de légionelle à 15°C, une légère diminution à 20°C et une augmentation à 25°C. Pour ces auteurs, en dessous d'une température de 25°C, les légionelles n'activent pas le gène global de régulation *csrA*, ce qui empêche la mise en place de la multiplication intracellulaire. Cette hypothèse pourrait expliquer le retard ou l'absence de prolifération des légionelles à 25°C par rapport à 40°C. Le retard de prolifération à 30°C, observé dans certains cas pourrait être dû à une différence dans la vitesse de mise en place des mécanismes physiologiques qui permettent aux légionelles la multiplication intra-amibienne. D'autres auteurs comme Rowbotham ont également souligné l'effet de la température. Une température de 30-35°C semble optimale pour la prolifération de la bactérie alors qu'à 21°C, il a constaté qu'il était plus difficile d'infecter les amibes (Rowbotham, 1980). L'importance du facteur température est soulignée également par Buse et Ashbolt. Lors de leur étude, ils ont pu constater à 24°C l'absence ou la faible multiplication de souches de *L. pneumophila*, au sein d'amibes de trois genres (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*) par rapport à des températures plus élevées (32, 37 et 41°C) qui elles, ont permis plus facilement la prolifération de ces légionelles (Buse and Ashbolt, 2011).

Nos résultats soulignent également un probable effet de la température : ainsi, à 25°C il a été difficile d'obtenir une prolifération de *Legionella*. Selon Fields *et al.*, Cette température est à la limite basse de la gamme de croissance de la bactérie, 25°C-40°C (Fields *et al.*, 2002). A 30°C, la prolifération (entre 1 et 2 log) a été possible pour toutes les souches sauf pour la souche 251 HT. Les proliférations observées à cette température de 30°C sont cohérentes avec celles relevées par d'autres comme par exemple Messi et *al.*, (Messi *et al.*, 2013). Enfin la température 40°C, proche de l'optimum de croissance de la bactérie, permet une cinétique de prolifération plus rapide qu'à 30°C.

3.3.Effet de la MOI

La comparaison de l'effet de la MOI 0,1 et 10 a été réalisée seulement pour la souche *L. pneumophila* Lens mais avec les 12 amibes sélectionnées ainsi que pour les 3 températures. Pour rappel lors de nos essais, la MOI a été fixée en ajustant la concentration en *Legionella*, la concentration en amibes est restée fixe à savoir 3.10^5 amibes/mL.

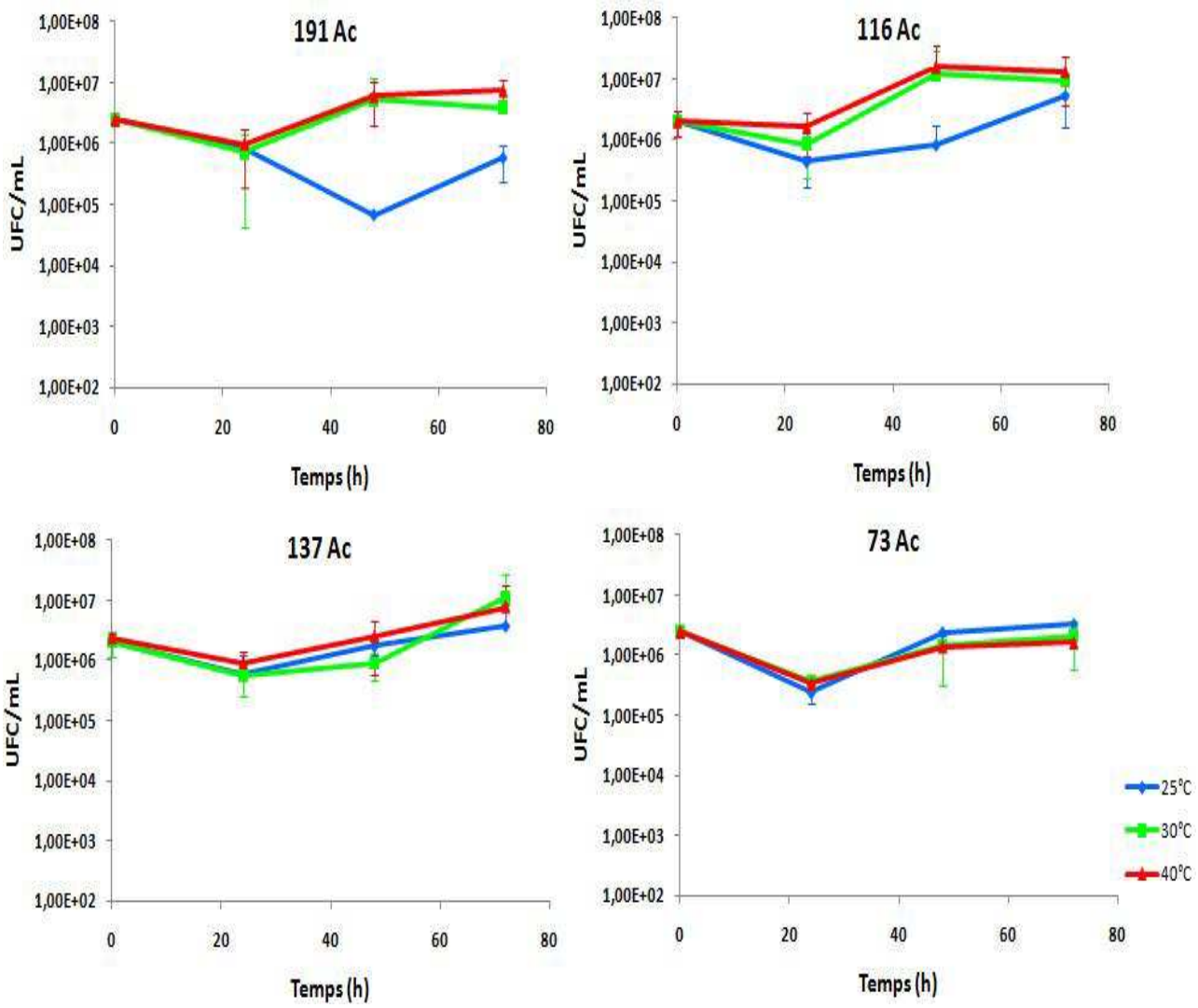


Figure 31 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de *L.p.* Lens en co-culture avec *Acanthamoeba* à la MOI 10

Les résultats des co-cultures avec les amibes du genre *Acanthamoeba*, montrent une faible prolifération de *L. pneumophila* Lens, inférieure à 1 log aux trois températures, Figure 31. La température n'a que très peu d'impact sur la multiplication, une stabilisation et un léger décrochage des concentrations respectivement à t 24 et 48 heures est observable pour les souches 191 Ac et 116 Ac. A 30°C et 40°C, les courbes sont superposables.

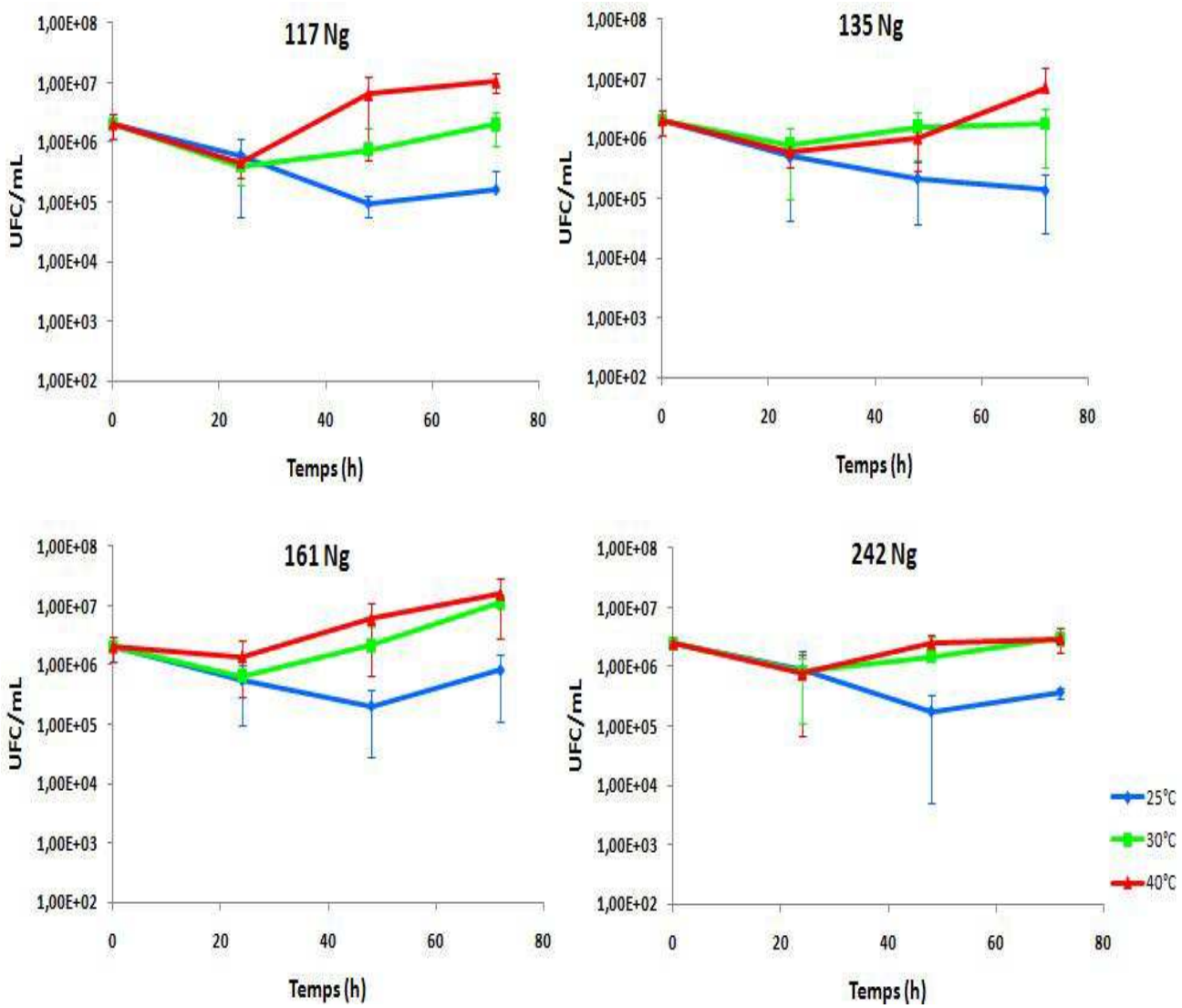


Figure 32 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de *L.p.* Lens en co-culture avec *Naegleria* à la MOI 10

Avec les amibes du genre *Naegleria*, les résultats des co-cultures indiquent également une absence ou une faible prolifération de *L. pneumophila* Lens dans ces conditions, Figure 32. Là aussi, l'effet de la température semble limité bien qu'à 25°C, les concentrations en légionelles à t 72 heures soient légèrement inférieures à celle initiales (- 1 log), excepté dans le cas des co-cultures avec la souche 161 Ng.

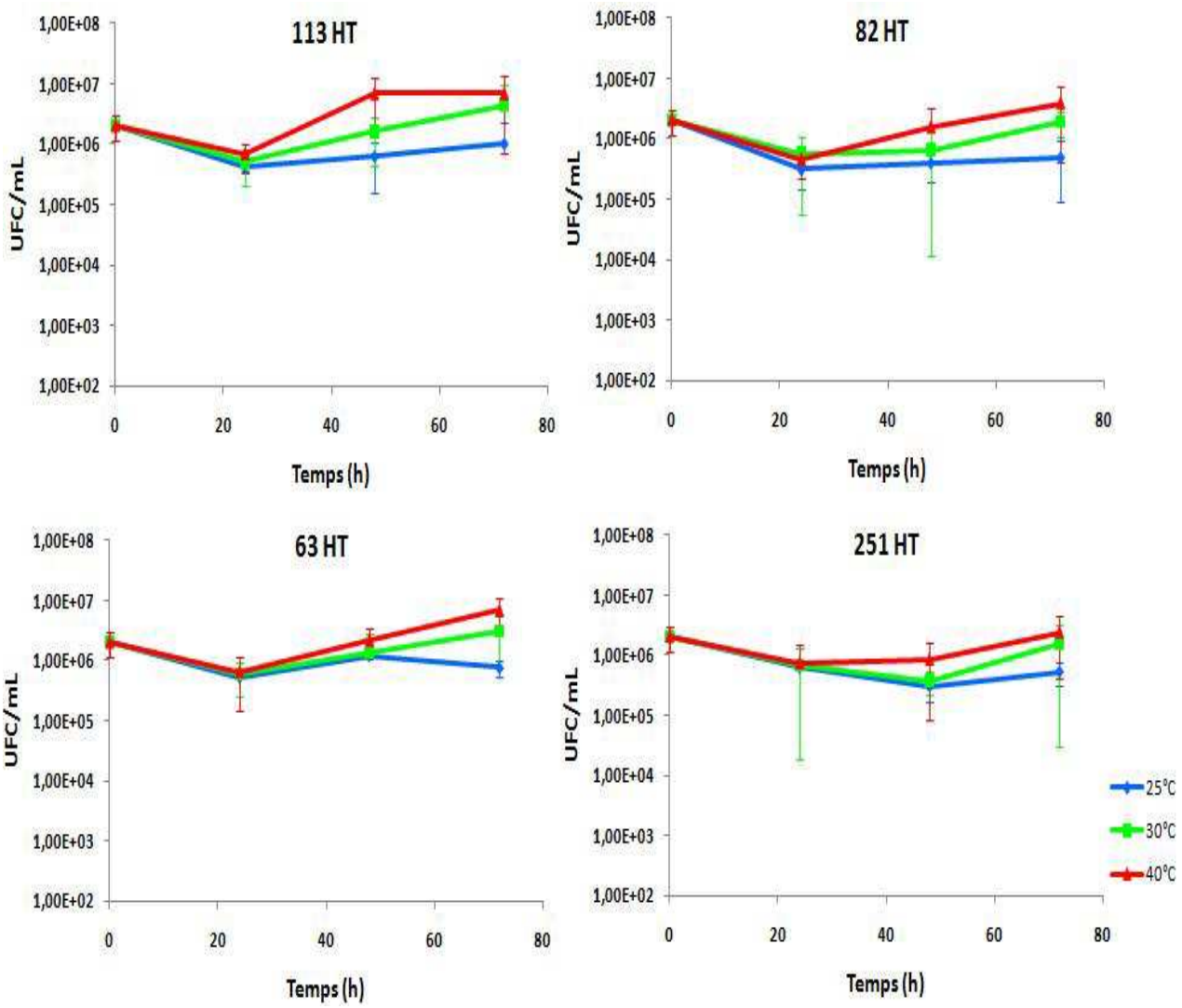


Figure 33 : Suivi des concentrations, sur 72 heures, de *L.p.* Lens en co-culture avec *Hartmannella* à la MOI 10

Les co-cultures à l'aide des souches appartenant au genre *Hartmannella* fournissent des résultats similaires à ceux observés avec les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* à savoir une absence ou une faible prolifération quelle que soit la température testée, Figure 33. De plus, pour ce genre amibien aucun effet de la température n'est observé, les courbes de suivi de prolifération se confondent aux écart-types près.

Au final, lors de ces tests il apparaît que la MOI 10 n'a pas permis la multiplication de *L. pneumophila* Lens comme ce fût le cas avec une MOI de 0,1. Pourtant d'autres auteurs (Dey *et al.*, 2009; Ohno *et al.*, 2008) ont réussi à faire proliférer *Legionella* avec des MOI plus fortes (MOI 50 pour Dey *et al.*et jusqu'à 1000 pour Ohno *et al.*, que la notre mais avec un protocole d'infection différent consistant à mettre en contact bactéries et amibes à une forte MOI pendant un laps de temps assez court (une à quelques heures) puis ensuite, les bactéries extracellulaires sont éliminées à l'aide de lavages et d'un traitement aux antibiotiques. Dans notre mode opératoire, les bactéries ont été laissées en contact avec

les amibes pendant toute la durée de l'essai, les bactéries extracellulaires n'ont pas été éliminées. Il s'agit alors peut-être d'un effet de saturation dû à la trop grande quantité de *Legionella* durant toute la durée du test : présentes en trop grand nombre dans le milieu, les amibes n'ingèreraient plus ces bactéries et les trophozoites amorceraient alors un enkystement rapide. Il pourrait s'agir également d'un effet cytopathogénique des légionelles. Les légionelles sont connues pour avoir un effet cytopathogénique sur les macrophages, c'est-à-dire qu'elles entraînent des modifications physiologiques préjudiciables pour la bonne santé des cellules (Husmann and Johnson, 1994). Cet effet semble être accéléré lors des infections à forte MOI. Gao *et al.*, lors d'infection de macrophages par *Legionella* constatent, dès 2 heures après la mise en contact, un effet plus rapide à une MOI de 50 qu'à des MOI plus faibles de 5 ou 0,5 (Gao and Abu Kwaik, 1999). Ces auteurs suggèrent alors que l'augmentation du nombre de bactéries intracellulaires ou l'accumulation de produits bactériens pourraient induire la cytopathogénicité. Lors de nos essais, nous n'avons pas réalisé de suivi de la sorte, il est donc difficile de corréler l'absence ou la faible prolifération à MOI 10 à un effet cytopathogénique. D'autres auteurs ont également observé une diminution de la multiplication des légionelles lorsque la MOI augmente (de 10 à 1000 mais avec un protocole d'infection différent du notre) (Ohno *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent que l'enkystement est induit, au moins en partie, par les légionelles via l'activation de voie métabolique chez l'amibe ; activation qui serait plus rapide pour les populations d'amibes en contact avec des fortes concentrations en *Legionella*. L'absence de prolifération à MOI 10 dans notre cas est peut-être due au protocole utilisé, les légionelles présentes en grande quantité durant toute la durée du test dans le milieu pourraient avoir induit un effet physiologique chez les amibes qui a limité ou inhibé la prolifération de *L. pneumophila* Lens.

4. Bilan des co-cultures

Les essais portant sur les co-cultures ont montré que les 12 souches d'amibes testées ont été perméables aux 2 souches de *L. pneumophila*. Le genre amibien n'est pas apparu comme un facteur discriminant pour la prolifération de *Legionella,* à contrario de ce qui est décrit dans la littérature où le genre *Acanthamoeba* apparaît comme le plus propice à la multiplication de *Legionella*. La comparaison des proliférations à 25°C et 40°C laisse entrevoir une influence de la température sur la prolifération ce qui est en accord avec la littérature. Par contre pour le facteur MOI, il est plus délicat de conclure ; dans nos tests la MOI la plus élevée (10) a inhibé ou limité la multiplication. Pourtant, d'autres auteurs ont observé des proliférations avec des MOI de 50 voir plus lors de leur test de co-culture mais avec un protocole d'infection différent du notre. Dans notre cas, un effet de cytopathogénicité ou bien un effet physiologique sur les amibes comme par exemple l'induction d'enkystement est peut être responsable de la différence des observations faites à MOI 10 par rapport à la MOI 0,1.

SEPARATION DES LEGIONELLES EN FONCTION DE LEUR ETAT D'ASSOCIATION

Legionella est fréquemment retrouvée dans les environnements aquatiques et est capable d'infecter de nombreuses amibes. Bien que la relation entre amibe-légionelle soit décrite, la proportion de *Legionella* intra et extracellulaires dans les échantillons n'est pas connue. A partir de constat, l'objectif de cette partie a été de mettre au point un protocole permettant de séparer les légionelles selon leur état d'association : libres ou bien associées aux amibes sous forme trophozoite et/ou kyste et ce sans utiliser des méthodes de culture qui pourraient modifier la proportion de *Legionella* de chacune des associations. Le but, à terme, est d'appliquer un traitement chimique, après avoir utilisé ce protocole pour séparer les *Legionella*, afin de déterminer la sensibilité des légionelles en fonction de leur état d'association. Définir l'état d'association des légionelles pourrait également servir à d'autres perspectives comme par exemple pour étudier l'écologie des légionelles et mieux connaître la relation amibe-légionelle.

Afin de réaliser cette séparation, divers traitements ont été testés. Les paragraphes suivants décrivent le cheminement suivi pour la mise au point des protocoles et les tests menés avec différents types d'échantillons afin d'évaluer ces protocoles. Les résultats obtenus sont ensuite discutés.

5. Choix de la méthode de séparation : essais préliminaires

Dans le but de réaliser la séparation des légionelles sous ses différentes associations avec les amibes, il est nécessaire de séparer également les trophozoites et les kystes amibiens. L'objectif, dans un premier temps, a été de cribler différentes méthodes utilisées dans d'autres disciplines de biologie afin d'en sélectionner une appliquable à notre problématique et qui permette de collecter facilement les différents micro-organismes (*Legionella*, amibes sous forme trophozoite ou kyste) pour pouvoir ensuite les dénombrer et/ou réaliser des observations au microscope de ces cellules après marquage. Pour ce faire, des essais préliminaires de faisabilité avec différentes techniques séparatives (la séparation par gradient de Percoll, la séparation par immuno-capture et la séparation par filtration) ont été réalisés. La méthode la plus prometteuse a été développée et évaluée.

5.1.Séparation par gradient de Percoll

Le gradient de Percoll testé a été celui décrit par Bracha *et al.*, 1982 puis complété par Avron et *al.*(Avron *et al.*, 1983). Dans leur étude, il a été mis en œuvre pour séparer, par centrifugation, des prékystes et des kystes d'une souche d'amibe parasitaire *Entamoeba invadens* et de deux souches d'*E. histolytica* et non de souches d'amibes libres comme dans notre cas. Le principe d'une séparation sur gradient est de séparer les cellules en fonction de leur densité, après centrifugation, dans un gradient de densité réalisé, le cas échéant à l'aide de différentes concentrations en Percoll. Le protocole détaillé est fourni dans le 8.2 du matériel et méthodes. Il a été décidé de tester ce protocole car, les séparations sur gradients sont utilisées pour séparer divers types de cellules, virus ou organites cellulaires. Nous voulions tester si cette méthode était appliquable pour la séparation des légionelles et des amibes (trophozoites et kystes).

5.1.1. Séparation trophozoites/kystes

Les premiers essais ont été menés soit avec des trophozoites seuls, soit avec des kystes seuls, du genre *Acanthamoeba*, afin de s'assurer qu'il était possible de récupérer les cellules après l'étape de centrifugation du gradient. Ces essais ont montré qu'après centrifugation, les trophozoites forment un amas, ce qui n'est pas le cas des kystes qui forment une bande diffuse (colorés en rouge à l'aide d'un marqueur cellulaire le rouge de Congo), Figure 34.

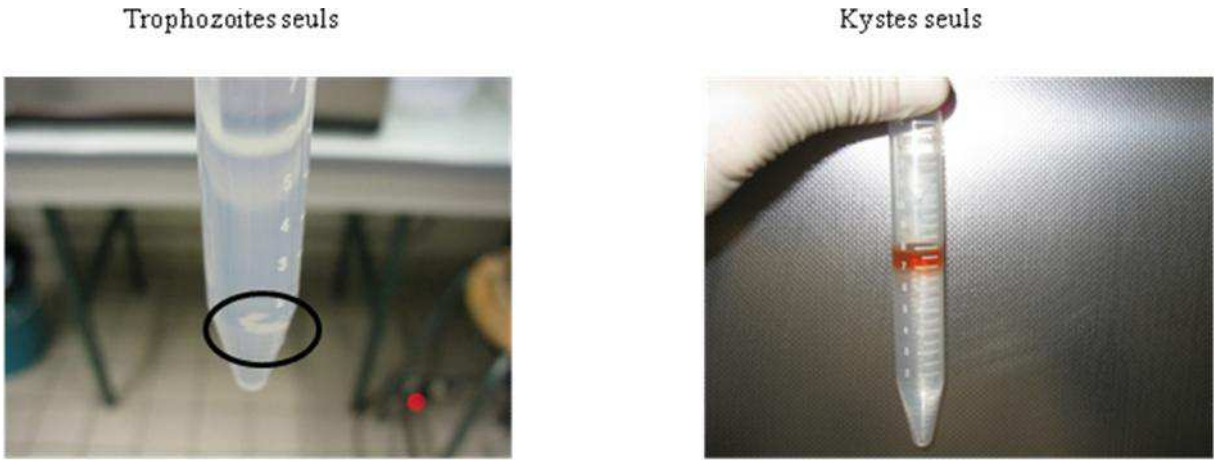


Figure 34 : Comparaison de la séparation de trophozoites seuls et de kystes seuls d'*Acanthamoeba* sur gradient de Percoll

La position dans le gradient, des trophozoites et des kystes est cohérente avec les résultats obtenus par Avron *et al.*. Les trophozoites ont été retrouvés dans le bas du gradient, au-dessus de la phase 100% de Percoll. Quant aux kystes, bien qu'ils n'aient pas formé de bande aussi nette que pour les trophozoites,

ils ont été visibles dans la partie haute du gradient correspondant aux densités les plus faibles (phase 20% de Percoll).

Les tests suivants ont été effectués en mélangeant les deux formes d'amibes en proportion égale (10^5 cellules de chaque forme). Après centrifugation, une bande a été obtenue pour les trophozoites mais cette fois-ci pour les kystes aucune bande n'a été visible. Il se peut que la répartition des kystes dans le gradient ait été plus diffuse. D'après Avron et *al.*, les kystes, après centrifugation dans le gradient, sont retrouvés aux interphases 20-30% et 30-40% (Avron *et al.*, 1983).

Après ces constatations, il a été décidé de modifier le gradient de Percoll en ne conservant que les phases permettant de culoter les trophozoites et les kystes, Figure 35. L'idée a été de conserver seulement la phase 40% pour que les kystes soient récupérés dans le haut de cette phase ainsi que les phases 70 et 100% de Percoll pour récupérer les trophozoites à cette interphase. Bien que lors de nos essais, les kystes ont été visibles dans la phase 20% de Percoll, d'après Avron *et al.*, les kystes peuvent être retrouvés aux interphases 20-30% et 30-40% de Percoll. C'est pourquoi il a été décidé de conserver la phase 40% pour ce nouveau gradient afin de s'assurer que les kystes resteraient dans la phase supérieure du gradient. En conservant seulement la phase 20%, le risque de voir les kystes se retrouver à l'interphase avec la phase 70% aurait été pris, ce qui aurait limité la capacité de séparation du gradient.

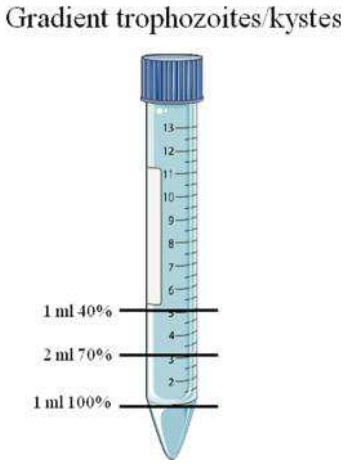


Figure 35: Gradient de Percoll simplifié pour la séparation trophozoites/kystes

L'utilisation de ce gradient a permis de rendre à nouveau visible une bande, mais le pouvoir séparateur du gradient a été affecté. Lors d'un premier essai, seuls les trophozoites ont pu êtres collectés après centrifugation, lors d'un second essai dans les mêmes conditions, seuls les kystes l'ont été. Ces résultats soulignent le manque de reproductibilité de la méthode ainsi que la difficulté à collecter les cellules dans le gradient après la centrifugation.

5.1.2. Séparation amibes/légionelles

Les tests de séparation amibes légionelles ont été menés avec des amibes du genre *Acanthamoeba* sous les deux formes (trophozoites et kystes) mais séparément pour chaque test c'est-à-dire soit trophozoites/*Legionella*, soit kystes/*Legionella*. Les essais de séparation ont montré la formation de 3 bandes après centrifugation sur gradient, Figure 36. Une fois collectées à l'aide d'une pipette pasteur, les différentes phases ont été observées au microscope. Cette observation, Figure 36, a montré que la bande du milieu était formée par des agrégats composés en majorité d'amibes mais dans lesquels des bactéries ont pu être observées. L'observation de la bande située en haut du gradient a montré qu'elle a été formée par les légionelles parmi lesquelles quelques amibes sont observables. Finalement, la bande inférieure a été formée par les amibes.

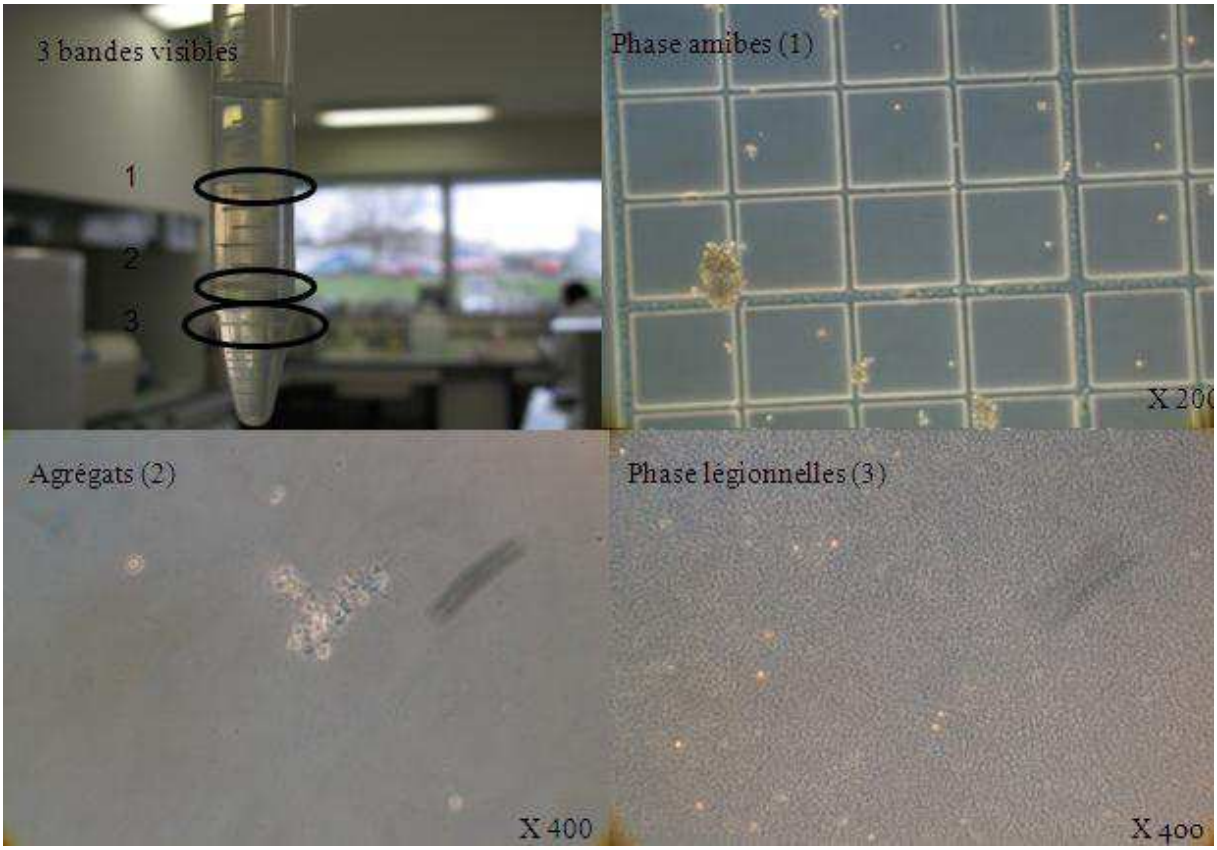


Figure 36 : Observation des 3 phases différentes obtenues après séparation de légionelles et d'amibes (trophozoites) par un gradient de Percoll

La séparation n'a pas été parfaite entre les différentes cellules, mais les résultats sont cohérents avec ceux attendus d'après les résultats d'Avron *et al.*, (Avron *et al.*, 1983). Les amibes ont été collectées dans le haut du gradient à l'interphase 30-50% de Percoll et les bactéries dans le bas du gradient à l'interphase 80-100% de Percoll ce qui correspond à une densité de 1,08 et 1,13 g/mL respectivement. Les *Legionella* libres ont également été collectées, dans des gradients de Percoll, à des densités

comprises entre 1,074 à 1,119 g/mL par d'autres auteurs (Garduno *et al.*, 1998). La méthode ne semble toutefois pas assez sensible pour séparer finement les deux types de micro-organismes.

Le gradient utilisé pour la séparation trophozoite-kyste a été celui décrit pour la séparation des kystes et prékystes et pour des amibes parasitaires. L'absence de description d'autres gradients de Percoll dans la littérature a rendu délicate toute modification de ce gradient et, le fait de ne conserver que certaines phases, a probablement affecté l'efficacité de séparation du gradient. Di Giovanni *et al.*, concluent sur cette méthode de séparation, lors d'une étude sur la détection oocystes de *Cryptosporidium* spp., qu'elle est bon marché mais longue et délicate et avec une récupération imparfaite comme dans notre cas (Di Giovanni *et al.*, 1999). De plus, ces auteurs ajoutent que la séparation sur gradient n'est pas très efficace pour éliminer les particules fines des eaux brutes ce qui aurait pu poser problème lors de l'utilisation de cette méthode sur des échantillons complexes. Devant l'absence de reproductibilité, la difficulté de la réalisation de ces gradients et l'absence de résultats probants, il a été décidé d'abandonner cette méthode pour séparer légionelles et amibes.

5.2.Séparation par immuno-capture

La méthode d'immuno-capture a pour but de récupérer les légionelles libres présentes dans un échantillon pour ensuite pouvoir les quantifier par PCRq, par exemple. Le principe de la méthode est basé sur un couplage anticorps-antigène : des anticorps préalablement greffés sur des billes magnétiques vont se lier de façon spécifique aux antigènes de surface de *Legionella*. Les billes sur lesquelles les *Legionella* sont piégées sont ensuite récupérées à l'aide d'un aimant. Le protocole utilisé lors de ces tests est décrit dans le paragraphe 8.3 du matériel et méthodes. Dans notre cas, cette méthode a pour but de séparer les *Legionella* libres du reste de l'échantillon. Il a été choisi de tester cette méthode car elle décrite dans la littérature, notamment par Allegra *et al.*, 2011 comme efficace pour collecter des *Legionella* dans un échantillon complexe et limiter les effets négatifs de la flore interférente.

5.2.1. Séparation *Legionella/E.coli*

Avant de réaliser des tests en échantillon complexe, il est nécessaire de réaliser des essais avec des échantillons en matrice simple, afin de valider la spécificité des anticorps ainsi que la faisabilité de cette méthode de séparation. Pour ce faire, des essais ont été menés en introduisant deux bactéries dans du tampon phosphate : *L. pneumophila* Lens et *E. coli* à la concentration théorique de 1.10^7 cellules/mL. Le dénombrement des cellules adhérées aux billes ou présentes dans le surnageant a été réalisé avant et après immuno-capture. *Legionella* devant être théoriquement retrouvées sur les billes et absentes du surnageant et inversement pour les bactéries *E. coli*.

Tableau 11 : Dénombrement de *Legionella* et *E. coli* avant et après séparation par immuno-capture

Bactéries	Avant immuno-capture UFC/mL	Après immuno-capture UFC/mL	
		Billes	Surnageant
L. pneumophila Lens	$2{,}1.10^7 \pm 0{,}5.10^7$	$5{,}8.10^6 \pm 0{,}8.10^6$	$7.10^4 \pm 3{,}5.10^4$
Escherichia coli	$1{,}1.10^6 \pm 0{,}4.10^6$	$3{,}3.10^3 \pm 0{,}3.10^3$	$5{,}4.10^6 \pm 0{,}2.10^6$

Les résultats présentés dans le Tableau 11, indiquent une concentration d'environ un facteur 100 des légionelles par cette méthode. En effet, la concentration en légionelles est environ 100 fois plus importante sur les billes que dans le surnageant. A noter toutefois, que le dénombrement des micro-organismes sur les billes a sans doute été sous-estimé car plusieurs légionelles peuvent être capturées par bille. En effet, plusieurs anticorps sont greffés par bille, ce qui implique que plusieurs légionelles peuvent être capturées sur une bille (Allegra *et al.*, 2011). Lors de ces tests, *Legionella* n'a pas été décrochée des billes. Ceci a été visible sur boîte par l'apparition de colonies de taille plus importante. Le Tableau 11 montre également que la majorité des bactéries *E.coli* n'a pas été capturée par les billes montrant la spécificité des anticorps utilisés. Au final sur les billes le ratio légionelles/*E. coli* est d'environ 1000 et il est d'environ 0,01 dans le surnageant. Selon Yañez *et al.*, cette méthode permet d'enrichir un échantillon en *Legionella* avec un taux de récupération de *Legionella* dans des échantillons d'eaux distillée de 47 à 71% (Yanez *et al.*, 2005), comparable à celui observé pour d'autres bactéries (*Mycobacterium avium*, *Campylobacter jejuni* ou bien encore *Cryptococcus neoformas*).

Dans notre cas, en faisait le ratio entre le dénombrement des légionelles capturées sur bille par rapport au dénombrement de légionelles introduites, le taux de récupération se situerait plutôt aux alentours de 30% ± 10%. Cette méthode paraît donc intéressante pour récupérer et dénombrer des légionelles dans un échantillon simple ne contenant que des bactéries.

5.2.2. Test d'immuno-capture d'amibes

Dans le but d'évaluer la possibilité d'utiliser cette méthode, des essais ont également été menés avec des amibes seules, sous forme trophozoite et kyste, pour s'assurer de l'absence d'adhésion des amibes aux billes. La concentration initiale, en amibes, testée était d'environ 10^3 amibes/mL. Le dénombrement des amibes a été réalisé par la méthode NPP 3 avant et après immuno-capture en ensemençant les billes et le filtrat. Les tests ont été menés avec les trois genres amibiens (*Acanthamoeba, Hartmannella* et *Naegleria*), le Tableau 12 présente la moyenne de ces tests.

Tableau 12 : Dénombrement des amibes (*Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria*), par méthode NPP 3, avant et après séparation par immuno-capture

Type cellulaire	Avant immuno-capture NPP/mL	Après immuno-capture NPP/mL	
		Billes	Surnageant
Trophozoites	$8{,}9.10^2 \pm 3{,}7.10^2$	$4{,}6.10^1 \pm 4{,}1.10^1$	$3{,}9.10^2 \pm 1{,}2.10^2$
Kystes	$7{,}8.10^2 \pm 5{,}5.10^2$	$5{,}2.10^2 \pm 5{,}5.10^2$	$1{,}7.10^2 \pm 1{,}2.10^2$

Les résultats des tests de la méthode d'immuno-capture d'amibes montrent que les amibes notamment les kystes interagissent pour partie avec les billes, Tableau 12. Pour les trophozoites, il en a été retrouvé en moyenne 10 fois plus dans le surnageant que sur les billes, la majorité des trophozoites a été collectée dans le surnageant ce qui correspond au résultat attendu. Par contre pour les kystes les résultats sont inversés, la majorité des kystes a été collecté avec les billes. Pour les trois genres testés, il a toujours été retrouvé des amibes sur les billes (résultats non montrés). La présence de ces kystes sur les billes est difficile à interpréter puisque les kystes n'ont pas la même capacité d'adhésion aux surfaces que les trophozoites qui peuvent adhérer grâce à leurs pseudopodes. A ce jour, il n'y a pas d'explication à cette adhésion.

Les résultats montrent que la méthode d'immuno-capture est une bonne méthode pour récupérer et concentrer les légionelles dans un échantillon simple ne contenant que des bactéries. Par contre la présence d'amibes dans l'échantillon ne semble pas compatible avec cette méthode, puisque les amibes, notamment sous forme kystique, peuvent adhérer en grand nombre aux billes, ce qui dans des essais de séparation de légionelles libres et intra-amibiennes, rend caduque l'utilisation de cette technique. Cette adhésion a lieu malgré l'agitation lors de l'étape d'adhésion entre le micro-organisme et l'anticorps greffé sur la bille magnétique. L'immuno-capture n'est donc pas apparue compatible avec l'objectif que nous avions fixé pour cette méthode et qui consistait à collecter seulement les légionelles seules et pas celles associées aux amibes.

5.3.Séparation par filtration sur membrane

Les essais préliminaires de filtrations ont eu pour objectif de vérifier la capacité des filtres choisis à laisser passer les *Legionella* libres et à retenir les amibes. Il a été décidé de tester des filtres, en acétate de cellulose, de porosité de 3 et 5 µm. D'après Pernin *et al*., des filtres de 3 µm permettent de décontaminer une eau de rivière en amibes même celles du genre *Hartmannella* qui sont de tailles plus petites que celles du genre *Naegleria* et *Acanthamoeba* (Pernin *et al.*, 1998). Les filtres de 5 µm ont une taille de pore supérieure et sont donc susceptibles de mieux laisser passer les *Legionella* libres ainsi que les agrégats présents dans les échantillons d'eaux naturelles. Les tests ont été menés avec des

kystes puisqu'ils présentent une taille inférieure à celle des trophozoites. La partie 8.4 du matériel et méthodes décrit la filtration.Ces tests ont été réalisés en filtrant 10 mL d'échantillon contenant 10^4 amibes et 10^7 légionelles. Le Tableau 13 présente la moyenne des résultats (n=3) menés avec les trois genres amibiens testés. Les concentrations en micro-organismes ont été déterminées par la méthode NPP 3 et seulement dans le filtrat, l'objectif étant de s'assurer que les *Legionella* libres traversent bien le filtre mais pas les kystes.

Tableau 13 : Dénombrement des micro-organismes par méthode NPP 3 avant et après filtration (n=3)

Porosité du filtre	*Legionella* (UFC/mL)		Kystes d'amibes (UFC/mL)	
	Avant filtration	Dans le filtrat	Avant filtration	Dans le filtrat
3 µm	$8{,}9.10^5 \pm 3{,}7.10^5$	$5{,}1.10^5 \pm 5{,}1.10^5$	$1{,}1.10^3 \pm 0$	Absence de front
5 µm	$6.10^5 \pm 4{,}2.10^5$	$9{,}9.10^5 \pm 2{,}6.10^5$	$1{,}1.10^3 \pm 0$	Absence de front

Pour les amibes, après filtration aucun front sur les géloses ensemencées n'a été observé quelle que soit la porosité des filtres utilisés. Les kystes des trois genres amibiens ont donc été retenus sur les deux filtres y compris ceux d'*Hartmannella* décrits comme ayant une taille de 6 à 8 µm (Smirnov, 1999), ce qui est proche du seuil de coupure des filtres. Mais d'après les résultats obtenus, ce seuil est suffisant pour retenir ces kystes. Les résultats, pour le filtre 3 µm, sont cohérents avec ceux de Pernin *et al.,* qui indiquent que des filtres de 3 µm sont suffisants pour retenir les amibes, mêmes celles du genre *Hartmannella* (Pernin *et al.*, 1998).

Quant aux *Legionella*, le filtre de porosité de 3 µm permet de récupérer la moitié de ces bactéries dans le filtrat mais avec un écart-type très important soulignant une mauvaise reproductibilité d'une filtration à une autre. Le filtre de porosité de 5 µm permet en revanche de collecter, dans le filtrat, l'ensemble des légionelles libres qui ont été introduites dans l'échantillon à filtrer. Dans la littérature, une taille de pore de 0,2 µm est décrite comme très efficace pour récupérer des *Legionella* sur un filtre (Smith *et al.*, 1993). D'autres auteurs ont préalablement suggéré qu'une porosité de 0,45 µm est une taille assez faible pour prévenir le passage de ces bactéries au travers du filtre (Orrison *et al.*, 1981). Par ailleurs, Payment *et al.*, ont collecté 83% des *Legionella* sur des cartouches filtrantes de porosité de 3 µm, lors de la filtration de 20 L d'eau (Payment *et al.*, 1989). Ce taux de récupération sur les filtres peut paraître élevé comparé à nos résultats qui indiquent qu'environ 50% des *Legionella* n'ont pas traversées ce filtre. Néanmoins, Payment *et al.*, précisent que pour leurs essais, ils ont favorisé la rétention de *Legionella* grâce à l'ajout de chlorure d'aluminium et l'utilisation de pH acides.

Lors de nos essais, la filtration sur membrane de porosité 5 µm a permis de recueillir dans le filtrat les légionelles en concentration identique à celle de l'échantillon de départ. De plus, les kystes semblent être collectés sur le filtre puisque l'ensemencement du filtrat, après filtration, ne révèle pas la présence

d'amibes (absence de front). Pour le protocole visant à séparer les légionelles en fonction de leur état d'association, les filtres de porosité 5 µm ont été choisis pour être incorporés dans un protocole plus complexe. Leur taille de pore supérieure facilite le passage des légionelles et des petits agrégats qui sont présents dans les échantillons complexes sur lesquels des bactéries peuvent être adhérées. Cette taille de pore s'avère tout de même assez faible pour retenir les kystes sur les filtres.

6. Mise en place du protocole de séparation des légionelles en fonction de leur état d'association

Suite aux essais préliminaires menés avec les différentes méthodes de séparation il a été décidé de poursuivre avec la filtration sur membranes pour séparer les légionelles libres des légionelles associées aux amibes. La méthode de séparation sur gradient de Percoll et celle par immuno-capture ne sont pas apparues compatibles avec notre objectif de séparation à l'inverse de la filtration qui permet de collecter les *Legionella* dans le filtrat et les kystes sur le filtre. Néanmoins deux verrous restent à débloquer pour effectuer cette séparation. Tout d'abord, il faut s'assurer que les trophozoites résistent à la filtration puis il faut séparer les légionelles intra-trophozoites des légionelles intra-kystes.

Un schéma global pour la quantification des *Legionella* en fonction de leur état d'association a été mis en place, Figure 37. Il présente les types de méthodes utilisées et résume de quelle manière la quantification des différents types d'associations a été envisagée.

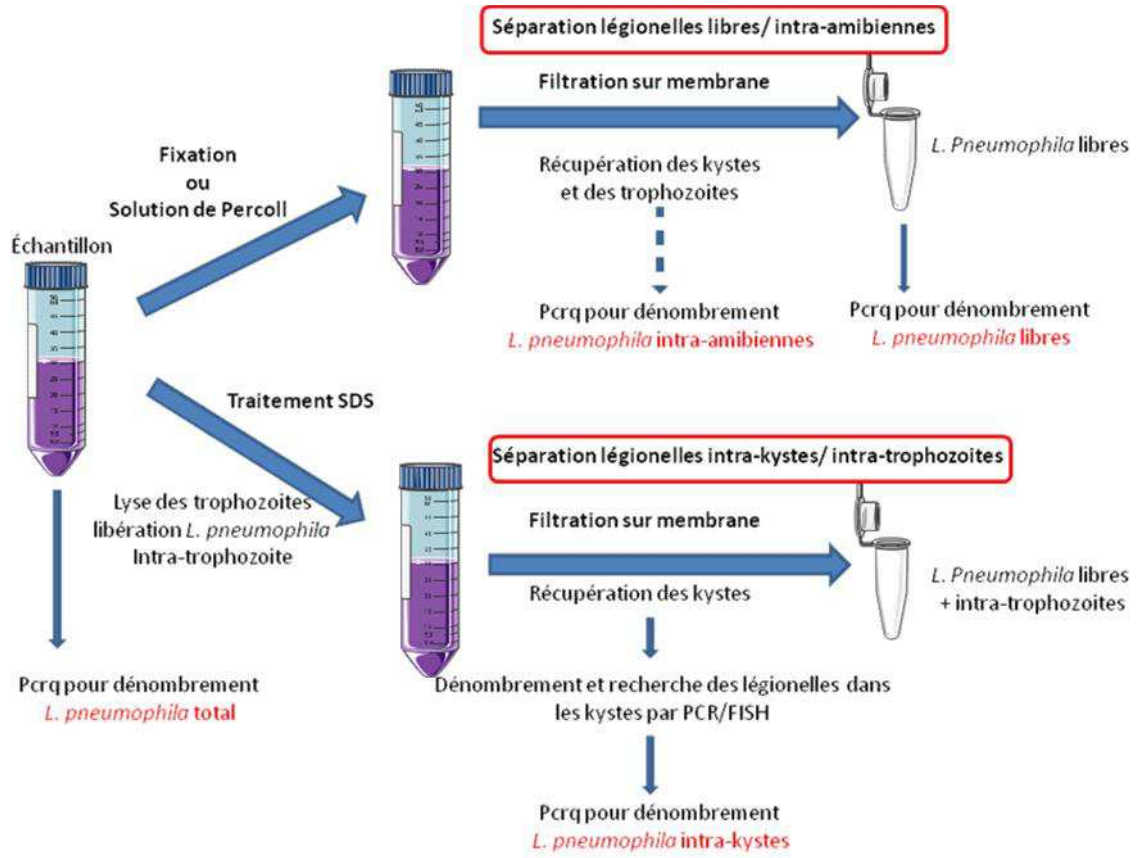


Figure 37 : Schéma global des traitements envisagés pour la séparation des légionelles selon leur état d'association

Afin de séparer les deux types de légionelles associées aux amibes, il a été choisi d'appliquer un traitement à l'aide d'un détergent, le SDS, pour lyser les trophozoites et ne conserver que les kystes et a fortiori, les *Legionella* qu'ils pourraient contenir. Dans la littérature, il est rapporté qu'un traitement à une concentration de 0,5% de SDS entraîne la lyse immédiate des trophozoites mais pas des kystes (Dudley *et al.*, 2009). Après vérification de ce point, ce traitement au SDS a été utilisé dans un protocole plus complexe visant à séparer légionelles intra-trophozoites et intra-kystes qui est détaillé après la partie concernant la séparation légionelles libres et légionelles associées aux amibes.

La méthodologie développée vise à collecter et à quantifier d'un coté les *Legionella* libres et d'un autre coté les *Legionella* intra-kystes. La différence entre les concentrations en *L. pneumophila* totales de l'échantillon de départ dénombrées par PCRq et la somme des *L. pneumophila* libres et intra-kystes fournira la concentration en *L. pneumophila* intra-trophozoites. Le dénombrement des *L. pneumophila* intra-amibiennes offre aussi la possibilité de faire le bilan *L. pneumophila* totale égale aux *L. pneumophila* libres plus *L. pneumophila* intra-amibiennes.

Pour ce faire l'échantillon de départ est séparé en 2 parties, Figure 37 :

- Une première partie visant à séparer les *Legionella* libres des *Legionella* intra-amibiennes (trophozoites et kystes)
- Et une seconde partie visant à séparer les *Legionella* intra-kystes des autres *Legionella*.

L'évaluation des protocoles de ces deux séparations est présentée dans les deux paragraphes ci-dessous (7 et 9). Une étape de concentration par centrifugation pourra être ajoutée si la concentration dans l'échantillon est trop faible.

La méthodologie de séparation des légionelles selon leur état d'association est donc basée sur la mise au point de méthodes utilisant trois techniques principales :

- Un traitement par détergent au SDS pour lyser les trophozoites suivi d'une filtration sur membrane pour ne récupérer, sur le filtre, que les kystes et donc les légionelles intra-kystes
- Une méthode de fixation pour rendre les trophozoites résistants à la filtration suivie d'une filtration sur membrane pour ne récupérer que les légionelles libres dans le filtrat et les légionelles intra-amibiennes sur le filtre.

7. Séparation des légionelles libres/intra-amibiennes

La séparation des légionelles libres des légionelles intra-amibiennes doit être faite par filtration. Mais, les trophozoites, notamment ceux appartenant au genre *Naegleria*, sont fragiles et sont détruits, au moins en partie, lors de la filtration. D'après Pernin *et al.*, seuls 10% d'entre eux sont récupérés après filtration sur membrane de porosité 1,2 µm et avec une pression de filtration de 3 à 5 kPa (Pernin *et al.*, 1998). Pour des kystes de *Naegleria*, leur fragilité est moindre puisque les mêmes conditions de filtration permettent de collecter en moyenne 55% de ces kystes. Il est donc apparu nécessaire de trouver une technique afin de rentre les trophozoites voire les kystes plus résistants à la filtration pour éviter leur lyse et le relarguage des légionelles intra-amibiennes. Cette étape est une étape clef, car il a fallu identifier une méthode compatible avec la méthode de quantification par PCRq, voire avec la méthode de visualisation FISH. Les essais n'ont été menés qu'avec la forme la plus sensible à la filtration : les trophozoites.

7.1. Fixateurs Paraformaldéhyde et dérivés

7.1.1. Fixation à l'aide du paraformaldéhyde

Le paraformaldéhyde ainsi que les dérivés à base de formol sont de fixateurs souvent utilisés lors de la mise en œuvre de la méthode FISH. Lors de leur utilisation en méthode FISH, la fixation des cellules

est réalisée grâce à une incubation de 3 heures des cellules dans des solutions aqueuses de formol diluées (inférieures à 4%) (Amann *et al.*, 1990; Manz *et al.*, 1995). Le formaldéhyde va alors réagir avec les fonctions –NH3 des protéines pour former des ponts méthylènes (Puchtler and Meloan, 1985). Lors de ces essais, la compatibilité de cette méthode de fixation avec la méthode PCRq a été testée. Les premiers essais ont consisté à fixer des amibes avec du PFA 3%, comme le préconise le protocole de FISH, puis à les rincer ou non avec du PBS avant de réaliser une extraction d'ADN puis une PCR. La présence des produits de PCR a ensuite été vérifiée grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose.

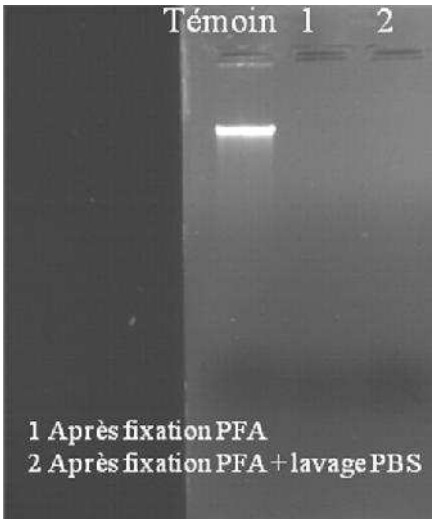


Figure 38 : Migration des produits de PCR amibe après fixation préalable au PFA

La Figure 38 montre l'absence de produits de PCR pour les PCR réalisées après l'étape de fixation au PFA, et ce même pour les cellules qui ont été rincées à l'aide de PBS. L'absence des produits de PCR peut s'expliquer par le fait que les fixateurs à base de formol endommagent les bases de l'ADN génomique (Quach *et al.*, 2004) et créent des liaisons avec les protéines (Puchtler and Meloan, 1985) susceptibles d'entraver la réaction de PCR. Lors de leur étude, Jackson *et al.*, n'ont pas réussi à amplifier l'ADN issu de tissus d'amygdales préalablement fixés à l'aide de paraformaldéhyde (Jackson *et al.*, 1990).

D'autres essais ont été réalisés avec des concentrations plus élevées en PFA (5X) en diminuant le temps de fixation (10, 30 et 60 minutes) afin de limiter les effets du fixateur. Lors de ces essais, l'ADN a été quantifié par PCRq car la séquence cible à amplifier en PCRq n'est qu'une centaine de paires de bases contre plusieurs centaines pour une PCR classique. D'après, Jensen *et al* la fixation au formaldéhyde empêche généralement l'amplification de fragments d'ADN plus grand que quelques centaines de paires de bases (Jensen *et al.*, 2010).

Les résultats de ces essais ont montré que la quantification par PCRq est également biaisée même après seulement 10 minutes de fixation. Ils ont conforté le fait que les fixations réalisées avec du PFA sont incompatibles avec une quantification par PCRq. Les altérations de L'ADN (fragmentation et pontage) entraînent une sous-estimation de la quantification probablement par le fait que la réaction d'amplification est entravée par ces altérations. La fixation des trophozoites avant filtration par le PFA n'est donc pas utilisable pour notre méthode de séparation.

7.1.2. Fixation à l'aide de tampon formaline

D'autres essais ont été réalisés avec un tampon formaline contenant du formol. D'après Roger *et al.*, ce tampon minimise les altérations de l'ADN lors de la fixation (Rogers *et al.*, 1990). L'absence d'altérations de l'ADN permet, d'après Palero *et al.*, le succès de l'amplification de l'ADN d'un tissu fixé à l'aide du tampon formaline (Palero *et al.*, 2010). Ce tampon a été testé sur des trophozoites du genre *Acanthamoeba* et la fixation a été effectuée pendant 2 heures à 4°C. Les résultats obtenus ont été similaires avec ceux obtenus après fixation au PFA, à savoir une diminution de la quantification par PCRq (-2,5 log). D'après Quach *et al.*, les effets de la fixation à l'aide d'un tampon formaline sont incertains, certains seraient réversibles tandis que d'autres non. Pour ces auteurs, la fixation à l'aide de ce tampon laisse apparaître des dommages aléatoires sur les bases de l'ADN qui peuvent être pontées. Lors de la PCR, l'ADN pourrait être « lu » par la Taq polymérase grâce à des erreurs de synthèse mais il se peut également que l'étape d'élongation soit bloquée (Quach *et al.*, 2004).

Au final, lors de nos tests une partie de l'ADN a vraisemblablement été altérée impactant ainsi la quantification. Les méthodes de fixation à base de formol nous sont donc apparues incompatibles avec la méthode de PCRq et non utilisables pour dénombrer les *Legionella* après séparation.

7.2.Fixateur à base de zinc

Des essais de fixation ont été menés avec une solution à base de zinc décrite par Lykidis *et al.* (Lykidis *et al.*, 2007). Ces auteurs ont utilisé ce fixateur sur différents tissus de souris (tissus épithéliaux, endothéliaux, nerveux et musculaires). Ils décrivent ce fixateur comme préservant l'ADN, l'ARN et les protéines, permettant ainsi l'analyse par PCR et PCRq des échantillons fixés. Des essais de fixation de trophozoites ont été effectués à l'aide de ce fixateur en les plaçant dans cette solution une nuit à 4°C. Leur aspect a été observé au microscope le lendemain, Figure 39 .

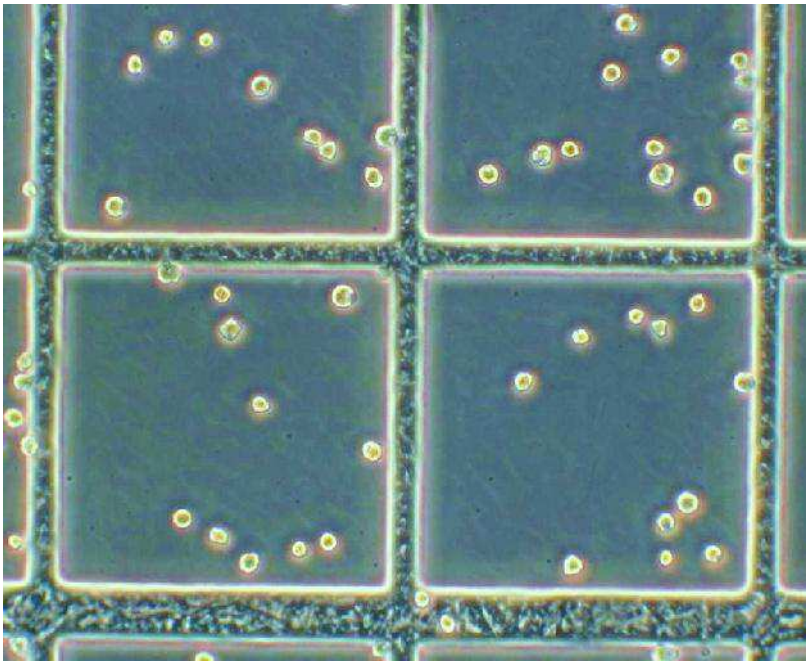


Figure 39 : Aspect des trophozoites après « fixation » dans un tampon à base de zinc (x400)

L'observation des trophozoites, après fixation dans le tampon à base de zinc, montre qu'ils n'ont pas été fixés. Les trophozoites présentent un aspect arrondi et n'ont pas été figés comme c'est le cas lors de la fixation au PFA par exemple. Dans leurs essais, Lykidis *et al.* ont fixé des tissus, dans notre cas il s'agissait de cellules seules, ce qui pourrait expliquer les différences de résultats obtenues pour la fixation. D'autres auteurs confirment également que ce tampon à base de zinc présente des avantages pour des analyses sur des tissues intacts car le zinc peut stabiliser certaines parties de la structure tertiaire des protéines lorsqu'elles sont soumises aux agents chaotropiques (Jensen *et al.*, 2010). De plus d'après ces auteurs, ce tampon serait bien adapté à la fixation de cellules seules. Or celà n'a pas été le cas dans nos essais de fixation. La capacité des trophozoites à s'enkyster lors de conditions défavorables, pourrait expliquer ce changement de morphologie par rapport à d'autres cellules qui ne possèdent pas de dimorphisme physiologique.

Cette méthode de fixation a certes permis de préserver l'ADN, des essais de quantification ont montré que la méthode est compatible avec la PCRq (données non montrées). Cependant la fixation n'est pas apparue suffisante pour figer les cellules. Au final, ces essais ont montré les limites du fixateur à base de zinc. Bien que la méthode soit compatible avec la PCRq, la fixation des trophozoites ne s'est pas avérée satisfaisante. D'autres fixateurs ont donc été testés.

7.3.Solution de Carnoy

Des essais de fixation ont été réalisés avec une solution dite de Carnoy à base d'éthanol. D'après Jackson *et al.*, cette méthode permet une meilleure préservation de l'ADN dans les tissus et l'extraction de molécules d'ADN de grand poids moléculaire et en quantité plus importante que lors d'une fixation au paraformaldéhyde (Jackson *et al.*, 1990). Les essais de fixation ont été menés avec des trophozoites d'*Acanthamoeba* qui ont été ensuite observés après l'étape de fixation, Figure 40.

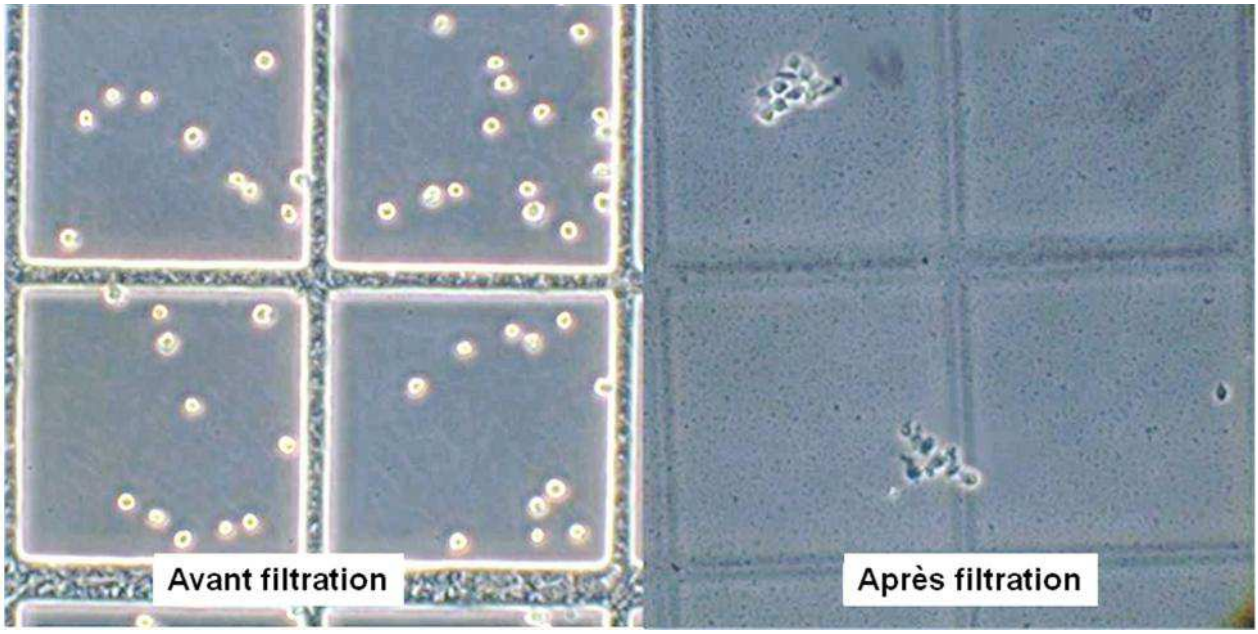


Figure 40 : Aspect des trophozoites avant et après fixation avec la solution de Carnoy (X400)

La fixation avec cette solution entraîne la lyse d'une grande partie des amibes, Figure 40. L'aspect arrondi des trophozoites avant la fixation provient du fait qu'ils ont été collectés après centrifugation entraînant ainsi une modification de morphologie temporaire. La lyse des trophozoites lors de la fixation est probablement due à la présence d'éthanol en grande quantité (60%) dans la solution de fixation. Ceci pourrait expliquer pourquoi cette méthode est décrite pour des fins histologiques et non pas pour des cellules seules. Au final la lyse des trophozoites est à l'opposé de l'effet recherché qui vise à savoir rendre plus résistant les trophozoites pour pouvoir les filtrer sans dommages. Cette méthode n'a donc pas été utilisée par la suite.

7.4.Fixation HOPE

La fixation HOPE a été décrite et mise au point par Olert *et al.* (Olert *et al.*, 2001). Le mécanisme de fixation n'est pas décrit dans le détail car la méthode a été brevetée. Les essais menés par cette équipe sur des tissus humains montrent qu'elle est compatible avec la PCRq. D'après eux, la méthode ne

dénature pas l'ADN et ne provoque pas de pontage dans la structure des protéines, des enzymes et des acides nucléiques. Après avoir effectué quelques tests préliminaires pour vérifier la compatibilité de cette méthode avec la PCRq nous avons modifié le protocole fourni par le fournisseur (étape de fixation à l'aide de la solution HOPE II supprimée). Cette étape a été supprimée car il est apparu très délicat de remettre en suspension les cellules après cette étape. La composition et le rôle des solutions HOPE I et HOPE II ne sont pas connus. Des tests de filtration de *Legionella* seules et de trophozoites d'*Acanthamoeba* ont été menés après avoir fixé les cellules grâce à ce fixateur.

Lors de ces tests, réalisés en triplicat, les concentrations en amibes ont été déterminées, par PCRq, dans l'échantillon de départ, ainsi que sur le filtre après l'avoir rincé à l'aide de PBS. Pour les essais avec les *Legionella*, les concentrations ont été dénombrées dans l'échantillon de départ, sur le filtre et dans le filtrat. Le but a été de vérifier que cette méthode de fixation permettait bien de récupérer les trophozoites (du genre *Acanthamoeba*) sur les filtres tout en préservant la capacité de séparation des *Legionella* libres par filtration, c'est pourquoi ces bactéries ont été dénombrées dans le filtrat mais aussi sur le filtre.

Tableau 14 : Dénombrement des micro-organismes, après fixation HOPE, avant et après filtration sur membrane (n=3)

Type de cellules	Avant filtration (UG/mL)	Filtre (UG/mL)	Filtrat (UG/mL)
Amibes (trophozoites d'*Acanthamoeba*)	$3,2 \pm 2,2.10^5$	$5,9 \pm 9,7.10^4$	ND*
Legionella libres	$3,1 \pm 2,6.10^7$	$3,5 \pm 4,2.10^5$	$8,5 \pm 6,3.10^6$

* Non Déterminé

Les résultats de ces tests, Tableau 14, indiquent que la séparation des *Legionella* libres est peu affectée par l'étape préalable de fixation HOPE. En moyenne, il est retrouvé 25 fois plus de *Legionella* dans le filtrat que sur le filtre. Néanmoins, la quantité de *Legionella* collectée dans le filtrat n'est pas égale à celle de l'échantillon de départ. Une partie des cellules a pu être perdue lors de la réalisation de filtration, de plus pour l'un des trois essais menés, seuls 10% des cellules ont été collectés dans le filtrat ce qui peut expliquer l'importance des écart-type et le fait que l'intégralité des cellules n'a pas été collectée dans le filtrat. Pour les trophozoites, le dénombrement du retentât indique qu'environ 20% des cellules sont retrouvées sur le filtre. L'important écart-type souligne des problèmes de reproductibilité entre les essais.

Au final, la méthode HOPE modifiée (suppression de la fixation à l'aide de la solution Hope II) est apparue à la fois compatible avec la méthode de quantification par PCRq, et avec une séparation par

filtration. Toutefois, la fixation des trophozoites n'est pas apparue suffisante, puisque seuls 20% des trophozoites ont été collectés sur le filtre. Le détail du mode opératoire de la fixation n'étant pas connu, il semblait délicat de le modifier et de l'améliorer. De plus, cette méthode de fixation est décrite pour la préparation de coupe en paraffine de tissus. Bien que le fabriquant précise que cette méthode peut être utilisée pour la fixation de bactéries, aucun article ne décrit l'utilisation de cette méthode pour des micro-organismes. Les essais avec cette méthode n'ont donc pas été poursuivis.

7.5.Filtration en solution de Percoll

Après avoir testé de nombreuses solutions de fixation sans avoir identifié une méthode répondant à l'ensemble de nos critères, il a été décidé de tester la filtration en présence d'une solution de Percoll. L'idée a été de resuspendre les cellules à séparer dans une solution de Percoll afin de profiter de la protection osmotique apportée par cette solution lors de la filtration.

Des essais préliminaires ont d'abord été réalisés après avoir remis en suspension des cellules de *Legionella* libres et de trophozoites d'*Acanthamoeba* dans des solutions de différentes concentrations en Percoll (20, 60, 80 et 100% de Percoll) et testé la filtration sur membrane d'acétate de cellulose de porosité 5 µm, Figure 41.

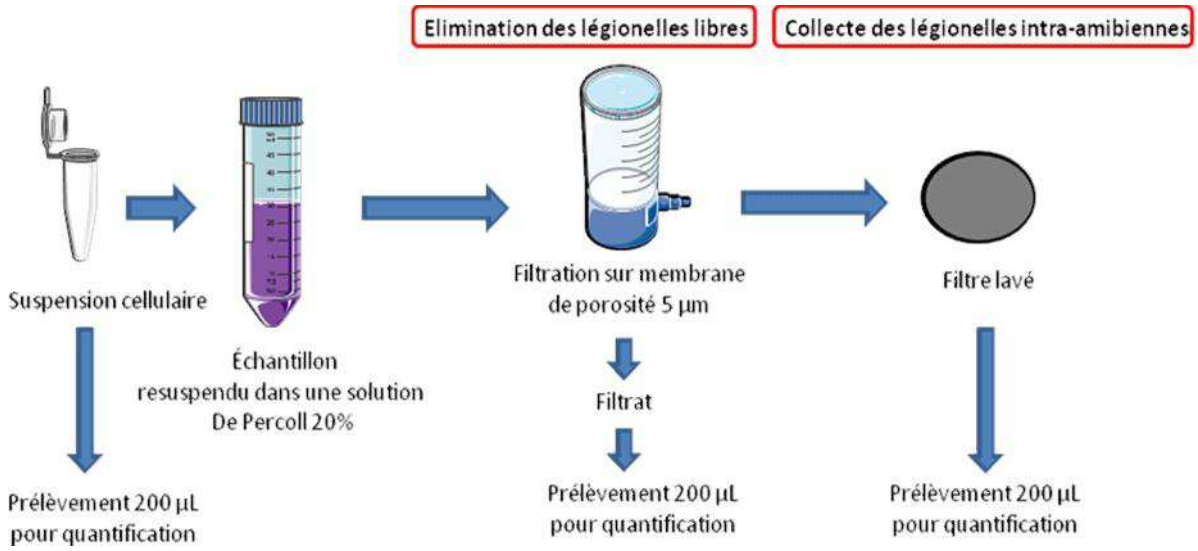


Figure 41: Schéma du protocole pour la séparation des légionelles libres et des légionelles intra-amibiennes

La condition optimale, c'est-à-dire celle qui permet la préservation des trophozoites mais qui n'entrave pas la filtration des légionelles, a été la solution à 20% de Percoll, Tableau 15. Les résultats de ces essais sont exprimés en quantité de cellules (UG).

Tableau 15 : Dénombrement des *Legionella* libres et des trophozoites d'*Acanthamoeba* avant et après filtration dans des solutions de Percoll de différentes concentrations (0, 20, 60, 80 et 100%)

		0% Percoll	20% Percoll	60% Percoll	80% Percoll	100% Percoll
Legionella libres	Avant	**$1{,}2.10^{9}\pm 8{,}8.10^{6}$**	**$1{,}2.10^{9}\pm 8{,}8.10^{6}$**	**$3{,}4.10^{7}\pm 2{,}1.10^{6}$**	**$3{,}4.10^{7}\pm 2{,}1.10^{6}$**	**$3{,}4.10^{7}\pm 2{,}1.10^{6}$**
	Filtre	**$2{,}2.10^{7}\pm 1{,}1.10^{6}$**	**$8{,}7.10^{6}\pm 1{,}6.10^{6}$**	**$3{,}2.10^{7}\pm 2{,}1.10^{6}$**	**$2{,}7.10^{7}\pm 2{,}3.10^{5}$**	**2.10^{7}**
	Filtrat	**$6{,}3.10^{8}\pm 1{,}6.10^{8}$**	**$8{,}1.10^{8}\pm 1{,}4.10^{8}$**	**$5{,}4.10^{5}\pm 1{,}1.10^{5}$**	**$3{,}7.10^{5}\pm 4{,}9.10^{4}$**	**$2{,}7.10^{5}\pm 3{,}7.10^{4}$**
Trophozoites d'*Acanthamoeba*	Avant	**$4.10^{6}\pm 3{,}4.10^{5}$**	**$4.10^{6}\pm 3{,}4.10^{5}$**	**$3{,}5.10^{5}\pm 6{,}5.10^{4}$**	**$3{,}5.10^{5}\pm 6{,}5.10^{4}$**	**$3{,}5.10^{7}\pm 5{,}3.10^{6}$**
	Filtre	**$1{,}2.10^{6}\pm 1{,}4.10^{5}$**	**$2{,}2.10^{6}\pm 2{,}8.10^{3}$**	**$7{,}5.10^{5}\pm 2{,}9.10^{5}$**	**$6{,}7.10^{3}\pm 5{,}1.10^{3}$**	**$6{,}5.10^{7}\pm 9{,}9.10^{6}$**
	Filtrat	**ND***	**$7{,}1.10^{4}$**	**ND***	**ND***	**ND***

* Non déterminé

7.5.1. Evaluation de la méthode de séparation des *Legionella* libres et intra-amibiennes

Ensuite, plusieurs types d'échantillons de laboratoire ont été testés afin de d'évaluer la méthode sur :

- Des *Legionella* libres (souche Lens)
- Des trophozoites d'*Acanthamoeba* et de *Naegleria* seuls
- Des *Legionella* intra-trophozoites (intra-*Acanthamoeba*)
- Des *Legionella* libres + des trophozoites d'*Acanthamoeba*

Lors de ces essais, seules des amibes du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria* ont été utilisées, la culture en milieu axénique n'étant pas bien maitrisée pour le genre *Hartmannella*. Les micro-organismes ont été dénombrés par PCRq dans l'échantillon avant filtration, sur le filtre après l'avoir rincé à l'aide de PBS et dans le filtrat. Les essais ont été menés en triplicats indépendants. De plus lors de chaque essai, trois filtrations ont été effectuées, l'objectif étant de vérifier la répétabilité de la méthode. Les résultats des filtrations sont présentés sous forme de tableaux et exprimés en quantité génomique (UG) et en pourcentage de cellules récupérées afin de comparer aisément les quantités recueillies sur le filtre et dans le filtrat par rapport à la quantité de cellules dans l'échantillon de départ.

7.5.1.1. *Legionella* libres

Les résultats des essais effectués avec des *L. pneumophila* Lens libres, Tableau 16 montrent des disparités entre les trois essais menés. Pour rappel, les résultats escomptés pour ces essais étaient de collecter un maximum des *Legionella* libres dans le filtrat.

Tableau 16 : Dénombrement des *Legionella* libres, mises en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Avant filtration (UG)	**$4{,}4.10^4 \pm 3{,}3.10^4$**	**$7{,}7.10^7 \pm 3{,}9.10^3$**	**$5{,}5.10^4 \pm 1{,}2.10^4$**
Filtre (UG)	**$5{,}6.10^3 \pm 6{,}2.10^3$**	**$7.10^6 \pm 1{,}4.10^6$**	**$3{,}2.10^4 \pm 1{,}9.10^4$**
Filtrat (UG)	**$5{,}5.10^4 \pm 1{,}8.10^4$**	**$5{,}3.10^7 \pm 1{,}3.10^7$**	**$3{,}3.10^4 \pm 1{,}5.10^4$**
Ratio filtrat/filtre	**10**	**8**	**1**
% récupéré sur le filtre	**13%**	**9%**	**58%**
% récupéré dans le filtrat	**125%**	**69%**	**60%**
Somme filtre + filtrat	**138%**	**78%**	**118%**

Il convient de noter que pour ces essais la somme des quantités de cellules du filtre et du filtrat est voisine de la quantité de cellules dans l'échantillon avant filtration, ce qui signifie que la méthode permet de collecter l'ensemble des cellules sans perte importante (somme filtre + filtrat). Dans le détail, c'est lors du troisième essai qu'il a été collecté autant de *Legionella* sur le filtre que dans le filtrat, à savoir $3{,}2.10^4$ UG. Les cellules ont donc été retenues sur le filtre de 5 µm lors de cet essai. Pour les essais 1 et 2, environ 10% des cellules ont été retenues sur le filtre, le reste des cellules ayant été retrouvé dans le filtrat comme attendu. Néanmoins, les écart-types sont importants soulignant une mauvaise répétabilité lors des 3 filtrations menées par essai. Cependant, l'importance des écart-types pour les dénombrements avant filtration, indique que la méthode de dénombrement génère des écart-types importants. En effet, les incertitudes dues aux prélèvements de l'échantillon, à l'extraction d'ADN ainsi qu'à la quantification de l'ADN par PCRq se cumulent ce qui, au final génère des écart-types assez importants. De ce fait, la répétabilité de la méthode n'est peut-être pas aussi mauvaise.

Au final, pour les *Legionella* libres, bien que la répétabilité de la méthode semble à améliorer, pour deux des trois essais, la filtration a bien permis de collecter ces *Legionella* dans le filtrat. Le dernier essai, par contre, n'a pas été aussi concluant ce qui souligne les problèmes de reproductibilité.

7.5.1.2. Trophozoites d'*Acanthamoeba* et de *Naegleria*

Pour les essais de filtration réalisés avec des trophozoites seuls d'*Acanthamoeba* ou de *Naegleria*, l'objectif a été de récupérer les UG sur le filtre. Les résultats des essais avec les amibes du genre *Acanthamoeba*, Tableau 17 et *Naegleria*, Tableau 18 montrent des écart-types importants, tout comme pour *Legionella*. Les étapes qui permettent la quantification ont pu, là aussi, générer des écart-types importants.

Tableau 17 : Dénombrement des *Acanthamoeba*, mises en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Avant filtration (UG)	**$2{,}3.10^{6}$**	**$6{,}3.10^{6} \pm 2{,}5.10^{6}$**	**$3{,}7.10^{6} \pm 1{,}9.10^{6}$**
Filtre (UG)	**$1{,}6.10^{6} \pm 1{,}7.10^{6}$**	**$3{,}4.10^{6} \pm 2{,}5.10^{6}$**	**$7{,}1.10^{5} \pm 4{,}2.10^{5}$**
Filtrat (UG)	**$5{,}6.10^{4} \pm 1{,}6.10^{3}$**	**$1{,}2.10^{5} \pm 1{,}9.10^{5}$**	**$8{,}5.10^{4} \pm 9{,}8.10^{4}$**
Ratio filtre/filtrat	**29**	**28**	**8**
% récupéré sur le filtre	**70%**	**54%**	**19%**
% récupéré dans le filtrat	**2%**	**2%**	**2%**
Somme filtre + filtrat	**72%**	**56%**	**21%**

Pour *Acanthamoeba*, lors des 3 essais, les quantités de cellules récupérées sur le filtre sont au moins 8 fois supérieures à celles collectées dans le filtrat. De plus pour les essais 1 et 2, entre 50% et 70% des trophozoites de la solution de départ ont été récupérés sur le filtre et les quantités mesurées sont du même ordre de grandeur que dans la solution initiale. Lors du dernier essai ce pourcentage diminue à 20% environ, et la quantité de cellules collectées (filtre et filtrat) n'est pas égale à celle de l'échantillon de départ indiquant qu'une partie des cellules a été perdue lors de la filtration. Cette perte pourrait avoir eu lieu lors de l'étape de lavage du filtre.

Tableau 18 : Dénombrement des *Naegleria*, mises en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Avant filtration (UG)	**$2{,}1.10^{7}$**	**$6{,}4.10^{3} \pm 2{,}7.10^{3}$**	ND*
Filtre (UG)	**$1{,}7.10^{7} \pm 5{,}6.10^{6}$**	**$7{,}9.10^{3} \pm 6.10^{3}$**	ND
Filtrat (UG)	**$3{,}9.10^{5} \pm 2{,}4.10^{5}$**	**$4.10^{3} \pm 4.10^{3}$**	ND
Ratio filtre/filtrat	**44**	**2**	ND
% récupéré sur le filtre	**81%**	**123%**	ND
% récupéré dans le filtrat	**2%**	**63%**	ND
Somme filtre + filtrat	**83%**	**186%**	ND

* Non déterminé

Pour *Naegleria*, les résultats sont moins tranchés, seuls deux des trois essais effectués sont valides. Lors du troisième essai, les quantités dénombrées sont apparues très basses. Un problème lors de l'essai ou lors de l'étape d'extraction pourrait expliquer un tel problème. Lors du premier essai, il été récupéré sur le filtre 80 % des cellules ($1{,}7.10^{7}$ UG versus $2{,}1.10^{7}$ UG) de l'échantillon de départ contre 2% dans le filtrat. Ce résultat est en accord avec ce qui été escompté. Par contre, lors du second essai, les quantités de cellules collectées dans le filtre et dans le filtrat sont supérieures à la quantité de cellules de l'échantillon initial (186%). Ceci est surprenant et pourrait s'expliquer par le fait que lors du prélèvement dans l'échantillon avant filtration, la solution n'était pas homogène. Néanmoins, lors de cet essai il a été récupéré 2 fois plus de cellules sur le filtre que dans le filtrat (ratio filtre/filtrat). Lors leurs essais de filtration de *Naegleria* Pernin *et al.*, n'ont pu récupérés que 10% des trophozoites (Pernin *et al.*, 1998), malgré les incertitudes de mesures, le taux de récupération dans notre cas semble amélioré.

Au final, la filtration des trophozoites en solution de Percoll à 20%, apparaît comme une méthode novatrice qui permet de collecter en moyenne la moitié des trophozoites d'*Acanthamoeba* lors de la filtration. La méthode permet donc de rendre plus résistants ces trophozoites lors de la filtration et leur récupération est facile. Elle reste toutefois à vérifier pour les trophozoites des autres genres amibiens.

7.5.1.3. *Legionella* intra-trophozoites

Les essais menés avec des trophozoites d'*Acanthamoeba* infectés, ont eu pour but de vérifier la collecte des *Legionella* intra-trophozoites sur le filtre. Les amibes ont également été dénombrées pour vérifier la résistance des trophozoites infectés à la filtration. Pour ces essais, les co-cultures ont été effectuées à 30°C pendant 30 heures afin d'obtenir des trophozoites infectés.

Tableau 19 : Dénombrement des micro-organismes, lors des essais avec des *Legionella* intra-trophozoites, mis en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration

		Essai 1	Essai 2	Essai 3
Avant filtration (UG)				
Legionella		**$6{,}3.10^4 \pm 6{,}3.10^2$**	**$8{,}4.10^4 \pm 1{,}8.10^4$**	**$9.10^4 \pm 5.10^4$**
Amibe		$8{,}7.10^5 \pm 2.10^5$	$6{,}2.10^5 \pm 4{,}8.10^5$	$4.10^6 \pm 4{,}1.10^5$
Filtre (UG)				
Legionella		**$5{,}6.10^4 \pm 2{,}5.10^4$**	**$6{,}3.10^4 \pm 2{,}4.10^4$**	**$2{,}6.10^4 \pm 6{,}3.10^3$**
Amibe		$7{,}2.10^5 \pm 2{,}5.10^5$	$5{,}7.10^5 \pm 4{,}1.10^5$	$6{,}3.10^5 \pm 1{,}9.10^5$
Filtrat (UG)				
Legionella		**$9{,}4.10^4 \pm 5{,}3.10^4$**	**$1{,}2.10^5 \pm 1{,}3.10^4$**	**$1{,}2.10^5 \pm 2{,}5.10^4$**
Amibe		$< LQ$ (2.10^3 UG)	$1{,}3.10^4 \pm 1{,}4.10^4$	$< LQ$ (2.10^3 UG)
Legionella	Ratio filtrat/filtre	**2**	**2**	**5**
	% récupéré sur le filtre	**89%**	**75%**	**29%**
	% récupéré dans le filtrat	**149%**	**143%**	**133%**
	Somme filtre + filtrat	**238%**	**218%**	**162%**
Amibe	Ratio filtre/filtrat	**ND***	**44**	**ND**
	% récupéré sur le filtre	**83%**	**92%**	**16%**
	% récupéré dans le filtrat	**0%**	**2%**	**0%**
	Somme filtre + filtrat	**83%**	**94%**	**16%**

* Non déterminé

Le dénombrement des amibes, Tableau 19 indiquent que lors des 3 essais, les amibes ont été collectées sur le filtre. Néanmoins, lors du troisième essai, la quantité collectée sur le filtre (16%) montre une importante perte de cellules non retrouvées dans le filtrat. Pour les *Legionella*, il a été retrouvé plus de cellules dans le filtrat que sur le filtre, ce qui est à l'opposé de ce qui était escompté. Par ailleurs, la comparaison entre la somme filtre + filtrat et la quantité initiale de *Legionella* est mauvaise puisque globalement cette somme est égale à 200% de la quantité initialement introduite. Mise à part une grande hétérogénéité (tous les trophozoites ne sont pas infectés et pas tous dans la même proportion) de la culture de trophozoites infectée, il est difficile de formuler des hypothèses concernant ce résultat.

Quant à la présence de *Legionella* en grand nombre dans le filtrat, elle aurait pu s'expliquer par la lyse des trophozoites lors de la filtration mais la quantité d'amibes collectées dans le filtrat a été, pour deux essais, inférieure à la limite de quantification. La présence de *Legionella* extracellulaires pourrait expliquer ce résultat mais il est difficile de concevoir qu'après lavage de la co-culture, les *Legionella* intra-trophozoites ne représentent pas la majorité des *Legionella*. Autre hypothèse, il se pourrait que

les trophozoites les plus infectés soient plus fragiles à la filtration et qu'ils aient été lysés lors de la filtration, relarguant ainsi les *Legionella* internalisées et qui ont commencé à se répliquer.

Au final, les résultats des dénombrements des *Legionella* intra-trophozoites sont difficiles à interpréter puisqu'elles ont été majoritairement retrouvées dans le filtrat alors que les trophozoites ont majoritairement été récupérés sur le filtre et ne semblent donc pas avoir été lysés, confortant ainsi les résultats obtenus lors de la filtration des trophozoites seuls.

7.5.1.4. *Legionella* libres + trophozoites

Une dernière série d'essais a été effectuée avec des trophozoites mélangés à des *Legionella* libres afin d'observer si la méthode permet de séparer ces deux micro-organismes et a fortiori les *Legionella* libres des *Legionella* associées aux amibes.

Tableau 20 : Dénombrement des micro-organismes, lors des essais avec des *Legionella* mélangées à des trophozoites, mis en suspension dans une solution de Percoll à 20%, avant et après filtration

		Essai 1	Essai 2	Essai 3
Avant filtration (UG)				
	Legionella	**$2{,}1.10^7 \pm 2{,}2.10^6$**	**$7{,}6.10^7 \pm 1.10^6$**	**$8{,}7.10^6 \pm 5{,}1.10^6$**
	Amibe	$6{,}4.10^6 \pm 2{,}4.10^6$	$3{,}1.10^6 \pm 6{,}5.10^5$	$6{,}1.10^5 \pm 1{,}3.10^5$
Filtre (UG)				
	Legionella	**$1{,}6.10^7 \pm 7{,}4.10^6$**	**$2{,}6.10^7 \pm 5{,}2.10^6$**	**$2{,}7.10^6 \pm 5{,}6.10^6$**
	Amibe	$3{,}5.10^6 \pm 6{,}7.10^5$	$2{,}1.10^6 \pm 1.10^6$	$6{,}1.10^5 \pm 3{,}9.10^5$
Filtrat (UG)				
	Legionella	**$4{,}2.10^6 \pm 3{,}9.10^6$**	**$6{,}5.10^7 \pm 3{,}4.10^7$**	**$4{,}2.10^6 \pm 1{,}7.10^6$**
	Amibe	$4.10^5 \pm 3{,}8.10^5$	$1{,}6.10^4$	$2{,}7.10^3 \pm 2{,}8.10^2$
Legionella	Ratio filtrat/filtre	**0,3**	**3**	**2**
	% récupéré sur le filtre	**76%**	**34%**	**31%**
	% récupéré dans le filtrat	**20%**	**86%**	**48%**
	Somme filtre + filtrat	**96%**	**120%**	**79%**
Amibe	Ratio filtre/filtrat	**9**	**131**	**225**
	% récupéré sur le filtre	**55%**	**68%**	**100%**
	% récupéré dans le filtrat	**6%**	**0%**	**0%**
	Somme filtre + filtrat	**61%**	**68%**	**100%**

Les résultats des essais de séparation de *Legionella* libres mélangées à des trophozoites, Tableau 20, montrent que lors des 3 essais, de 50 à 100% des trophozoites ont été collectés sur le filtre confirmant les résultats des tests précédents montrant que les trophozoites ne sont pas lysés lors de la filtration. Par contre pour les *Legionella*, les résultats sont plus disparates. Il faut noter que les quantités de *Legionella* introduites dans l'échantillon à filtrer sont plus importantes que lors des autres essais. Ces fortes concentrations ainsi que la présence des trophozoites ont peut-être limité le passage des *Legionella* au travers du filtre ou bien la présence particules de Percoll a permis un rapprochement physique entre les deux micro-organismes. *Legionella* pourrait ainsi se retrouver en contact avec les trophozoites ce qui limiterait l'efficacité de séparation par la filtration. Dans tous les cas, il convient de bien définir la méthodologie lors de la remise en suspension des micro-organismes dans la solution de Percoll. Il n'est pas possible d'effectuer une agitation à l'aide d'un vortex, au risque de lyser les trophozoites. Une méthode plus douce et bien calibrée est à envisager avant d'effectuer de nouveaux tests de séparation pour les échantillons contenant les deux micro-organismes.

Au final la séparation des légionelles libres et des trophozoites n'est pas concluante. Bien que les amibes soient arrêtées par le filtre, les *Legionella* libres le sont également pour partie. D'autres essais sont à envisager avec des concentrations en micro-organismes plus faibles afin de vérifier si le fait d'avoir utilisé des concentrations trop élevées a entraîné un colmatage du filtre, limitant ainsi le passage des *Legionella* au travers du filtre.

7.5.2. Bilan de la séparation des *Legionella* libres et intra-amibiennes

Après avoir testé différentes méthodes de fixation des trophozoites, c'est finalement la filtration en présence de Percoll qui a été compatible avec le double objectif de rendre les trophozoites plus résistants à la filtration tout en permettant leur quantification par PCRq. La méthode testée a consisté à mettre en suspension les micro-organismes dans une solution de Percoll à 20% afin d'éviter la lyse des trophozoites lors de la filtration. Elle a certes permis de limiter cette lyse lors de la filtration mais ne permet pas de bien séparer les *Legionella* libres de celles présentes dans les amibes sous forme trophozoites. Des essais supplémentaires sont à envisager en s'assurant d'avoir un échantillon homogène et dans lequel les légionelles et les amibes ne sont pas en interaction. En effet, les premiers essais sur la filtration de *Legionella* seules ont montré que la solution de Percoll à 20% n'entrave pas le passage de ces bactéries au travers du filtre. Par ailleurs, lors de ces essais les écart-types intra-essais se sont parfois révélés élevés indiquant une répétabilité médiocre. Afin de palier à ce problème, il conviendrait de standardiser la puissance de la filtration. En effet, lors de ces essais la dépression créée par la pompe a été comprise entre 7 à 13 kPa. Dans leur étude, Pernin *et al.*, ont utilisé une pression de 3 à 5 kPa lors des filtrations des kystes et de trophozoites de *Naegleria* (Pernin *et al.*, 1998). Lors de nos essais, la pression de la dépression n'a pas pu être aussi finement réglée, ce qui

pourrait, en partie, expliquer la mauvaise répétabilité lors des essais. De nouveaux essais, avec une pompe moins puissante, permettant de fixer la pression lors de la filtration sont à envisager dans le but d'augmenter la reproductibilité et ainsi de fiabiliser la méthode.

Pour autant, ces essais ont permis de mettre au point une méthode permettant de limiter fortement la lyse des trophozoites d'*Acanthamoeba* lors de la filtration. Des essais supplémentaires sont à effectuer pour fiabiliser la technique mais cette méthode pourrait à l'avenir être utilisée dans le cadre d'autres protocoles pour lesquels il est nécessaire de collecter les amibes. Les tests avec *Naegleria* sont à poursuivre pour vérifier la validité de cette méthode et d'autres sont à initier avec d'autres genres amibiens comme par exemple *Hartmannella*. La méthode pourrait également être utilisée pour déterminer la proportion kystes/trophozoites d'un échantillon puisque les trophozoites sont faciles à éliminer par un traitement détergent, le SDS par exemple.

8. Recherche de *Legionella* intra-kystes

Afin de pourvoir évaluer le protocole de séparation des *Legionella* totales et des *Legionella* intra-kystes, Figure 37, différents protocoles ont été testés afin de produire des *Legionella* intra-kystes. De plus, des observations de ces *Legionella* intra-kystes par méthode FISH ont été réalisées sur différents échantillons.

8.1. Visualisation de bactéries intra-kystes

Avant de réaliser l'observation de *Legionella* intra-kystes par méthode FISH, des essais ont été effectués avec la sonde bactéries totales (EUB 338) afin de s'assurer que la visualisation de bactéries intra-kystes était possible par le protocole FISH utilisé. Pour mémoire, le protocole consiste à fixer les micro-organismes à l'aide de PFA puis une fois les cellules fixées et perméabilisées, une hybridation est réalisée avec des sondes, marquées par un fluorochrome, spécifiques d'un fragment de l'ADN du micro-organisme. Le protocole détaillé est décrit dans le paragraphe 6.2 du matériel et méthodes.

Les premiers essais ont été effectués avec la sonde bactéries totales (EUB 338) et la sonde *Legionellacae* LEG 705 (utilisée comme témoin négatif dans ce test) sur des kystes d'*Acanthamoeba* provenant de culture sur gélose NNA-*coli,* afin de vérifier si les sondes de FISH sont capables de traverser la paroi des kystes et de s'hybrider avec les bactéries intra-kystes.

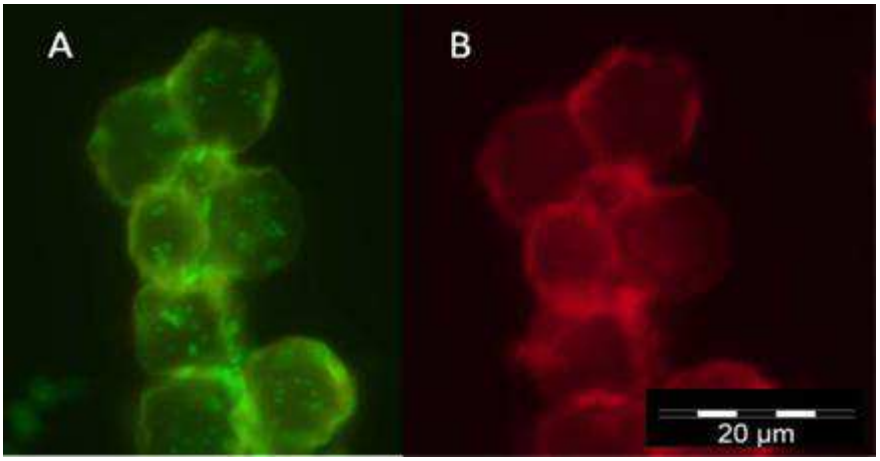


Figure 42 : Observation des kystes d'*Acanthamoeba* après hybridation (A) avec la sonde EUB, (B) avec la sonde LEG 705 (X400)

La Figure 42 montre la présence de bactéries intra-kystes détectées grâce à la sonde EUB 338 (A) et l'absence de détection de légionelles dans les kystes amibiens (B). Cette observation tend à montrer que les conditions de FISH utilisées permettent la détection des bactéries dans les kystes.

8.2.Production et recherche de *Legionella* intra-kystes dans des échantillons de laboratoire

Différents échantillons de laboratoire, pour lesquels il a été essayé d'obtenir des *Legionella* intra-kystes ont ensuite été préparés. L'objectif de ces protocoles a été d'infecter des trophozoites par des *Legionella* avant d'induire un enkystement et ainsi retrouver *Legionella* dans les kystes. Pour ce faire, le protocole testé a été celui décrit par Declerck et *al.*, de 2010. Brièvement, le protocole a consisté à réaliser des co-cultures en flasque, pendant 24 heures à température ambiante, après 2 heures de temps de contact à MOI 10, 37°C, avec *L. pneumophila* et des amibes du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria*. Après ces 24 heures, l'enkystement a été induit grâce un tampon (Declerck *et al.*, 2010). Les *Legionella* seraient ainsi piégées à l'intérieur des kystes. D'autres essais ont également été effectués en modifiant légèrement ce protocole. Au lieu de 2 heures de temps de contact légionelles/amibes à MOI 10, un temps de contact de 24 heures à une MOI de 2 a également été utilisé avant d'induire l'enkystement grâce à un tampon. Des observations microscopiques, lors d'une étude précédente avaient montré qu'après 24 heures de co-culture à MOI 2, les *Legionella* sont internalisées et la multiplication est initiée dans certains trophozoites.

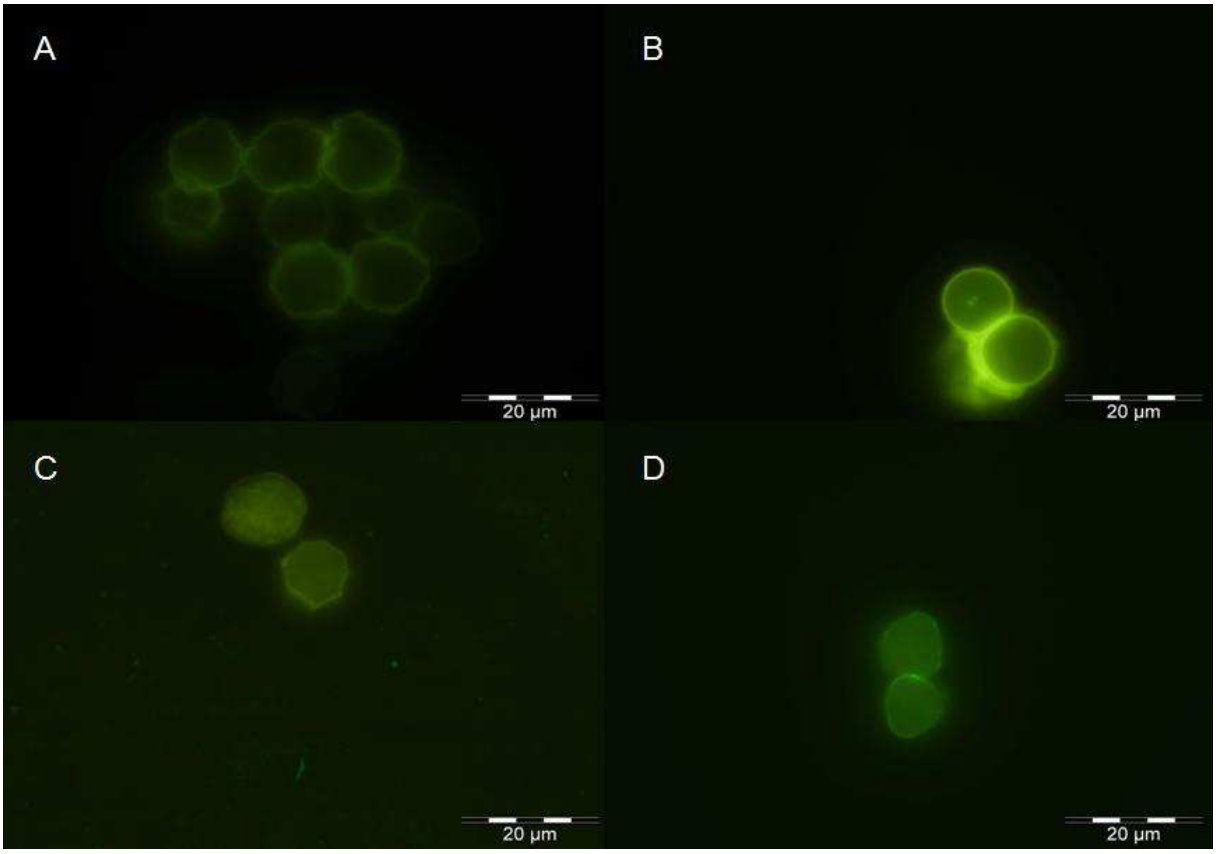


Figure 43 : Observation de kystes d'*Acanthamoeba* (A, C et D) et de *Naegleria* (B) potentiellement infectés par *Legionella*, après marquage à l'aide des sondes Legall 11, Legall 22, LEG 705 et LEG 226

Les différentes observations, après marquage par méthode FISH (sondes Legall 11, Legall 22, LEG 705 et LEG 226), n'ont pas permis d'observer de *Legionella* dans les kystes, Figure 43. Il convient de noter que lors de ces observations, les kystes sont apparus auto-fluorescents au niveau de leur paroi. L'absence de visualisation de *Legionella* intra-kystes peut soit signifier que ces sondes ne sont pas capables de pénétrer dans les kystes, soit indiquer que les protocoles de co-culture utilisés n'ont pas permis d'obtenir ces légionelles intra-kystes. En effet, les essais avec la sonde EUB 338 ont montré qu'il est possible d'observer des bactéries intra kystes par ce protocole, Figure 42. Il faut tout de même noter que les fluorochromes des sondes sont différents. La sonde EUB 338 est couplée au FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*) qui a une masse moléculaire de 389g/mol et la sonde LEG 705 à la Cyanine 5 qui a une masse molaire de 792 g/mol. La masse moléculaire plus faible du FITC confère peut-être à la sonde EUB une meilleure pénétration à l'intérieur des kystes. Quant aux sondes Legall 11, Legall 22, Leg 705 et Leg 226, utilisées par la suite, en cocktail pour la détection de *Legionella*, le fluorochrome qui leur est associé est le 6-FAM (*6- Carboxy-Fluorescein*), de masse moléculaire de 376 g/mol et pour la sonde LEGPNE1, le fluorochrome est la Cyanine 3, de masse molaire de 767 g/mol. La différence de masse moléculaire des fluorochromes peut, peut-être avoir un rôle quand à la pénétration des sondes dans les kystes.

Cependant, selon Declerck et *al.*, il est possible de visualiser les *L. pneumophila* Philadelphia à l'intérieur de kystes d'*Acanthamoeba castellanii* par méthode FISH notamment grâce à la sonde LEG705 (Declerck *et al.*, 2010). Il paraît donc peu probable qu'il s'agisse d'un problème méthodologique, lors du marquage par FISH, qui ait empêché d'observer *Legionella* dans les kystes.

L'absence de *Legionella* dans les kystes pourrait plutôt vernir du fait que nos conditions n'ont pas été strictement identiques à celles décrites par Declerck *et al.* (souche amibienne utilisée, température lors des étapes de lavage, aération du milieu). Le protocole décrit dans la publication, ne précise pas certains détails comme par exemple la température lors des étapes de lavage, l'aération du milieu. Ceci tend à montrer qu'il est difficile d'obtenir artificiellement des *Legionella* dans des kystes. Dans la littérature hormis dans les articles de Skinner *et al.*, et Kilvington et Price où des observations par microscopie à transmission, sur des échantillons artificiels, illustrent la présence de *Legionella* intra-kyste (Kilvington and Price, 1990; Skinner *et al.*, 1983), il n'est pas montré de kystes infectés. D'autres auteurs (Bouyer *et al.*, 2007; Greub and Raoult, 2003) n'ont pas non plus réussi à observer de *Legionella* intra-kystes. Pour Ohno *et al.*, les amibes expulseraient les *Legionella*, dans des vésicules, lors de l'enkystement plutôt que de les conserver dans les kystes (Ohno *et al.*, 2008). Ce type d'association ne pourrait être retrouvé seulement lors de conditions particulières et ne représenter qu'une faible proportion parmi les types d'associations amibes-légionelles possibles.

9. Séparation *Legionella* totales et *Legionella* intra-kystes

Tout comme pour la séparation des *Legionella* libres et des *Legionella* intra-amibiennes, la séparation des *Legionella* intra-kystes est basée sur la méthode de filtration. L'objectif a été, ici, d'éliminer l'ADN des légionelles libres et des légionelles intra-trophozoites pour ne conserver que l'ADN des légionelles intra-kystes et ainsi pouvoir les quantifier par PCRq. Les tests de ce protocole ont été réalisés à l'aide d'échantillons « simples » contenant seulement, dans du tampon amibe, soit des légionelles seules, soit des légionelles intra-trophozoites et leurs trophozoites ou soit des kystes d'*Acanthamoeba* ou de *Naegleria*. Des échantillons de pilotes de circuits de refroidissement alimentés en eau brute de rivière (Seine et Moselle), contenant des légionelles, ont également été utilisés lors d'essais préliminaires. Les micro-organismes (amibes et légionelles) ont été quantifiés par PCRq avant et après traitement.

9.1. Essais sur des eaux de pilote

Des eaux de pilotes industriels simulant les circuits de refroidissement (pilote SPECTRE) et alimentées en eau brutes de rivière Seine et Moselle contenant des amibes et des *L. pneumophila* ont été échantillonnées. Des échantillons de biofilms provenant de ces pilotes ont également été

échantillonnés puis remis en suspension dans de l'eau déminéralisée stérile par grattage et sonication. Les échantillons ont été stockés un mois maximum à 4°C. L'objectif a été de tester l'efficacité du protocole mis en œuvre. Il était escompté d'éliminer un maximum de *Legionella* et ainsi obtenir des dénombrements après traitement plus faibles qu'avant traitement.

Ces échantillons d'eau et de biofilm de pilote mimant un circuit à TAR ont été traités selon un protocole préliminaire articulé autour de deux étapes de filtration sur membrane, Figure 44. Après une première filtration sur membrane visant à éliminer les *Legionella* libres, le filtre a été récupéré et lavé avec 10 mL de tampon amibe supplémenté avec du SDS à une concentration finale de 0,5% afin de lyser les trophozoites. Une fois culotées, les cellules collectées ont subi un traitement au lysosyme à 1 mg/mL (concentration classiquement utilisée). L'objectif a été d'altérer la paroi des *Legionella* restantes et ainsi faciliter leur élimination lors de la seconde filtration sur membrane. Après la seconde filtration, le filtre récupéré a été lavé de la même façon qu'après la première filtration. Cette deuxième filtration et ce second traitement au SDS ont eu pour objectif d'augmenter l'efficacité du protocole. Finalement les cellules ont été remises en suspension après une dernière centrifugation pour être dénombrées par méthode PCRq ou observées après marquage par méthode FISH.

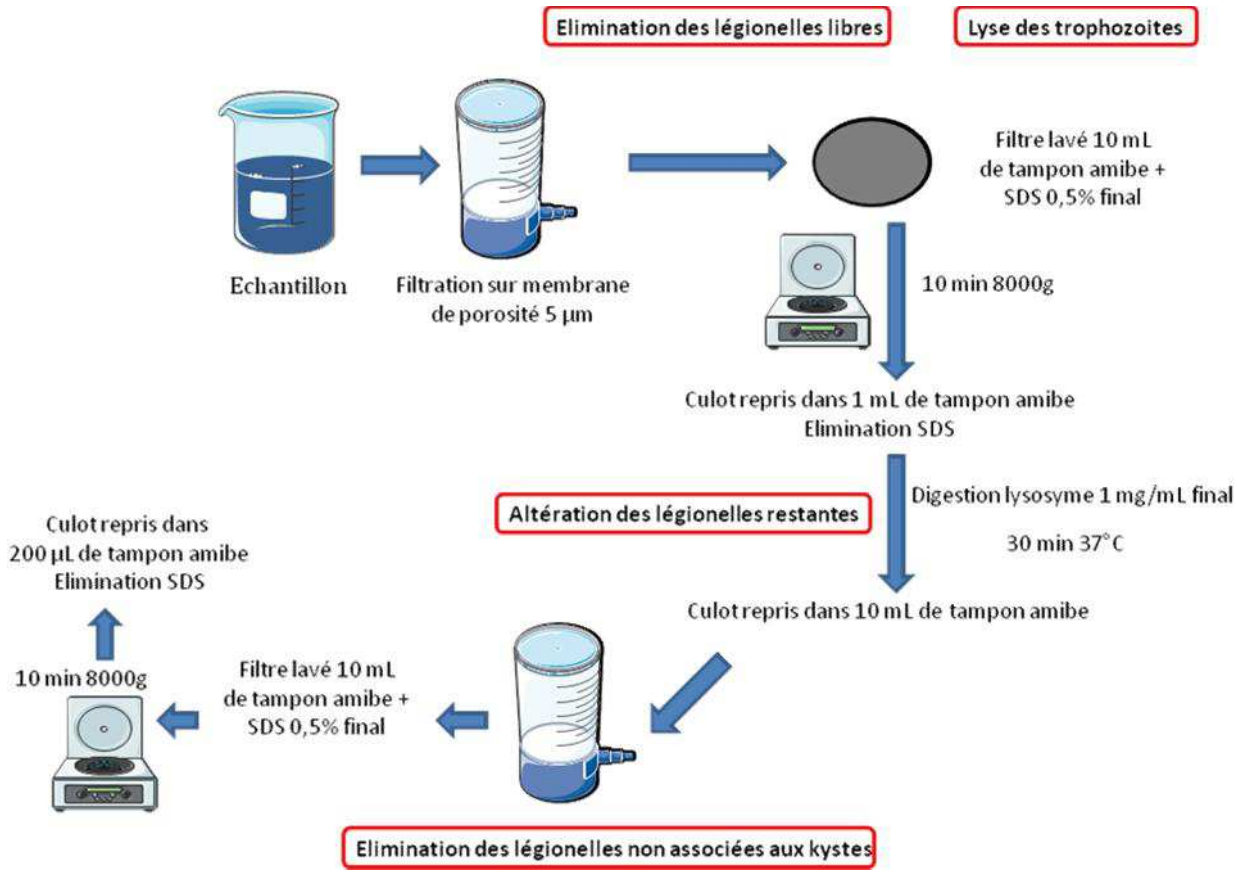


Figure 44 : Schéma global du protocole utilisé lors des premiers essais de séparation de *Legionella* totales et intra-kystes

Seules les *Legionella* ont été dénombrées lors de ces premiers essais. 5 échantillons environnementaux différents ont été traités lors de ces premiers essais.

Tableau 21 : Dénombrements des *Legionella* avant et après application du traitement sur les premiers essais échantillons environnementaux

Nom de l'échantillon	Dénombrement *Legionella* avant traitement	Dénombrement *Legionella* après traitement
Pilote SPECTRE Cattenom bassin froid Tr3	$1,7.10^4$ UG/L	< LQ (<10^4UG/L)
Pilote SPECTRE Nogent bassin froid 2 béton	$2,8.10^6$ UG/L	$8,1.10^5$ UG/L
Pilote SPECTRE Nogent bassin froid module 2	$2,3.10^5$ UG/L	$4,8.10^5$ UG/L
Pilote SPECTRE Nogent bassin froid 3 béton	$5,9.10^5$ UG/L	< LQ (<10^4UG/L)
Pilote SPECTRE Nogent bassin chaud 2	$1,8.10^6$ UG/L	$1,8.10^6$ UG/L

Chaque échantillon n'a été traité qu'une seule fois, l'objectif a été ici de réaliser une première évaluation du protocole. Les résultats, Tableau 21, montrent que pour 3 des 5 échantillons (SPECTRE Nogent bassin froid 2 béton, Nogent bassin froid module 2, Nogent bassin chaud 2), les concentrations en *Legionella* sont sensiblement identiques avant et après traitement. Pour l'échantillon du pilote SPECTRE Cattenom bassin froid Tr3, il est difficile d'évaluer l'efficacité du traitement car la concentration en *Legionella* dans cet échantillon s'est avérée proche de la limite de quantification ($1,7.10^4$ UG/L pour une limite à 10^4UG/L). Enfin, pour le dernier échantillon à savoir Nogent bassin froid 3 béton, le traitement a permis a minima d'éliminer 1,5 log d'ADN de *Legionella*.

Ces résultats indiquent que ce protocole est mal adapté aux échantillons environnementaux. Les *Legionella* ne semblent pas altérées lors des traitements au SDS et au lysozyme puisque les concentrations avant et après traitement sont sensiblement identiques. Il est peu probable que l'ensemble des *Legionella* de ces échantillons soient associées à des kystes amibiens. La complexité de la matrice de ces échantillons est peut être responsable de ce résultat, les *Legionella* ont pu être protégées par les MES présentes dans ces échantillons. D'après Dickenson et Sansalone, les matières en suspension d'une taille de plus de 75 µm peuvent apporter une protection aux micro-organismes grâce à des pores internes (Dickenson and Sansalone, 2011). En plus de la protection qu'ils peuvent apporter aux bactéries lors des traitements SDS et lysozyme, ces MES ont pu également colmater le filtre.

Afin de remédier à ce problème éventuel d'agrégats et dans le but de les casser un pré-traitement a été ajouté. Le protocole utilisé est celui employé par EDF pour dénombrer *Legionella* dans des échantillons environnementaux. L'absence d'effet sur les kystes d'*Acanthamoeba* et de *Naegleria* a été

vérifiée, au préalable, avant l'ajout de cette étape supplémentaire. Ce pré-traitement a consisté en l'ajout de billes de verre de 5 mm de diamètre à raison de 5 g pour 100 mL d'échantillon à traiter. L'échantillon a été ensuite remis en suspension par agitation à 800 rpm, à l'aide d'un barreau aimanté. Puis deux cycles constitués d'une minute de sonication à 40 kHZ, 100% suivi d'une minute d'agitation à 800 rpm ont été effectués. Il a également été décidé de porter la concentration en SDS de 0,5 à 2% lors du lavage du filtre afin de faciliter la lyse des bactéries. Les volumes collectés et filtrés ont également été modifiés afin de diminuer la limite de quantification.

9.2. Ajout du prétraitement et augmentation de la concentration en SDS

Un nouvel échantillon d'eau de pilote SPECTRE a été traité avec le protocole modifié (ajout du pré-traitement et concentration en SDS augmentée à 2%). Le traitement a été effectué en triplicat. La concentration en *Legionella* a été déterminée dans l'échantillon de départ, après traitement mais également dans les filtrats collectés après les deux filtrations afin d'observer les différentes étapes de filtration et en particulier l'élimination dans les filtrats de l'ADN des légionelles libres ou intra-trophozoites. Seuls les résultats du traitement sur *Legionella* sont présentés Tableau 22 puisque la proportion kyste/trophozoite dans l'échantillon environnemental n'a pas été déterminée. De ce fait l'impact de ce traitement sur les kystes amibiens ne peut être évalué. De plus, des observations au microscope ont été effectuées après fixation sur les échantillons collectés après traitement, Tableau 22.

Tableau 22 : Dénombrement de *Legionella* avant et après traitement, de l'échantillon environnemental, par le protocole complémenté par le pré-traitement et l'augmentation de la concentration en SDS (n=3)

	Echantillon initial	Filtrat 1	Filtrat 2	Après traitement
Legionella (UG/mL)	$3{,}5.10^4 \pm 1{,}5.10^4$	$1{,}8.10^4 \pm 1{,}6.10^4$	$8{,}8.10^3 \pm 7{,}8.10^3$	< LQ (<4.10^2UG/L)

Les concentrations en *Legionella* de l'échantillon environnemental étaient relativement faibles ($3{,}5.10^4$ UG/L) Tableau 22. D'après le Tableau 22, la somme des dénombrements de *Legionella* dans le filtrat 1 et 2 représente 76% de la quantité dénombrée au départ. Une partie des cellules a pu être perdue lors des différentes étapes, ou bien l'ADN libéré suite à la lyse des bactéries n'a pas pu être culoté par centrifugation, ou bien il s'agit simplement de l'incertitude de la méthode. Par ailleurs, la quantité de *Legionella* après traitement s'est avérée inférieure à la limite de quantification à savoir 4.10^2UG/L. Le protocole utilisé a donc permis d'éliminer efficacement l'ADN des *Legionella* (libres et intra-trophozoites), la moitié des *Legionella* a été collectée dans le filtrat 1 ce qui souligne l'efficacité de l'ajout du pré-traitement.

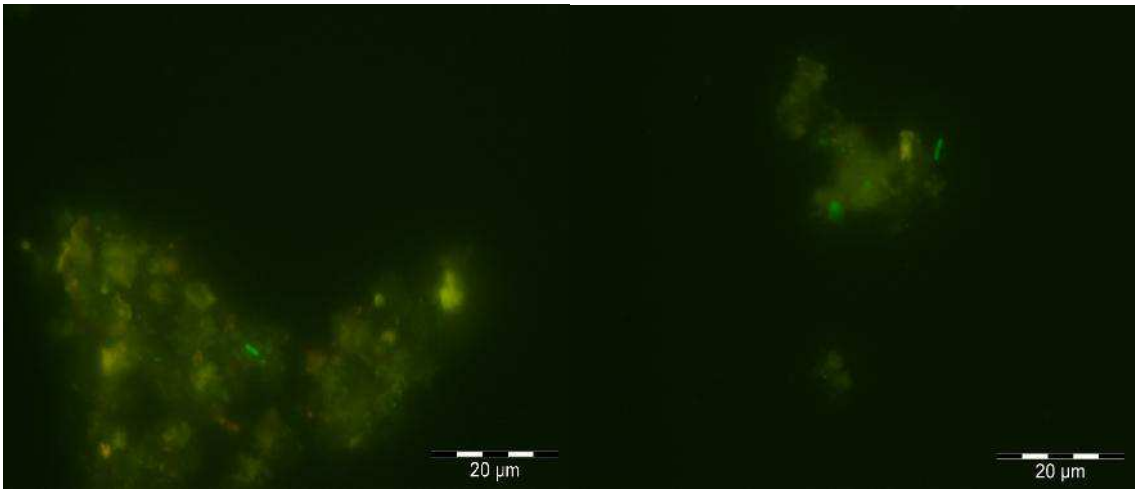


Figure 45 : Détection de légionelles par microscopie, après marquage par méthode FISH, dans des échantillons environnementaux traités par le protocole de séparation

L'observation au microscope, après marquage FISH (cocktail de sondes Legall 11, Legall 22, Leg 705 et Leg 226), des échantillons traités, montre la présence de *Legionella* dans des agrégats, Figure 45.
A noter qu'en dehors de ces agrégats, présents en faible nombre dans les champs d'observations, aucune *Legionella* n'a été visualisée, ce qui corrobore les résultats de PCRq qui ont montré l'efficacité du traitement sur *Legionella*. En effet, l'observation après marquage FISH, des échantillons traités indiquent la présence de rares *Legionella* dans des agrégats qui sont eux-mêmes peu nombreux. Par ailleurs, lors de ces observations aucune *Legionella* dans les kystes n'a pu être observée. Au final, des *Legionella* libres sont observables sur les agrégats qui n'ont pas été altérés lors du traitement.

Les résultats des dénombrements par PCRq et les observations microscopiques montrent que l'ajout du prétraitement et l'augmentation de la concentration en SDS lors du lavage des filtres ont amélioré l'efficacité du protocole concernant l'élimination des *Legionella*. La mise en œuvre de ce protocole sur des échantillons environnementaux ne permet pas d'évaluer son effet sur des kystes. Dans cet objectif, des essais complémentaires ont été réalisés.

A la suite de ces essais, des tests complémentaires sur des kystes d'*Acanthamoeba* et de *Naegleria* après traitement à une gamme de SDS allant de 0,5 à 2% ont montré une altération de la viabilité des kystes, notamment ceux du genre *Naegleria*. Dans le cadre du protocole de séparation des *Legionella* intra-kystes, des concentrations finales en SDS supérieures à 0,5% ne peuvent donc pas être utilisées au risque d'altérer la viabilité des kystes de *Naegleria* et d'entraîner le relarguage d'éventuelles légionelles intra-kystes. Dans la littérature, il est décrit qu'un traitement au SDS à 0,5% permet la lyse immédiate des trophozoites d'*Acanthamoeba* et altère les kystes immatures mais pas les kystes matures (Coulon *et al.*, 2010; Dudley *et al.*, 2009; Khan, 2006). D'autres auteurs ont même utilisé une concentration en SDS de 0,1 % pour lyser des trophozoites d'*A. polyphaga* (Gryseels *et al.*, 2012;

Lamrabet *et al.*, 2012). De faibles concentrations en SDS sont donc suffisantes pour lyser les trophozoites, c'est sans doute pourquoi il n'est pas fait mention dans la littérature de concentrations plus élevées.

9.3.Evaluation du protocole de séparation *Legionella* totales et *Legionella* intra-kystes

Suite à ces résultats, il a été décidé d'utiliser des échantillons de laboratoire en matrice simple (tampon amibe) et d'évaluer l'efficacité du protocole complété et modifié, Figure 46 , sur des *Legionella* seules, des *Legionella* mélangées avec des kystes et des *Legionella* intra-trophozoites.

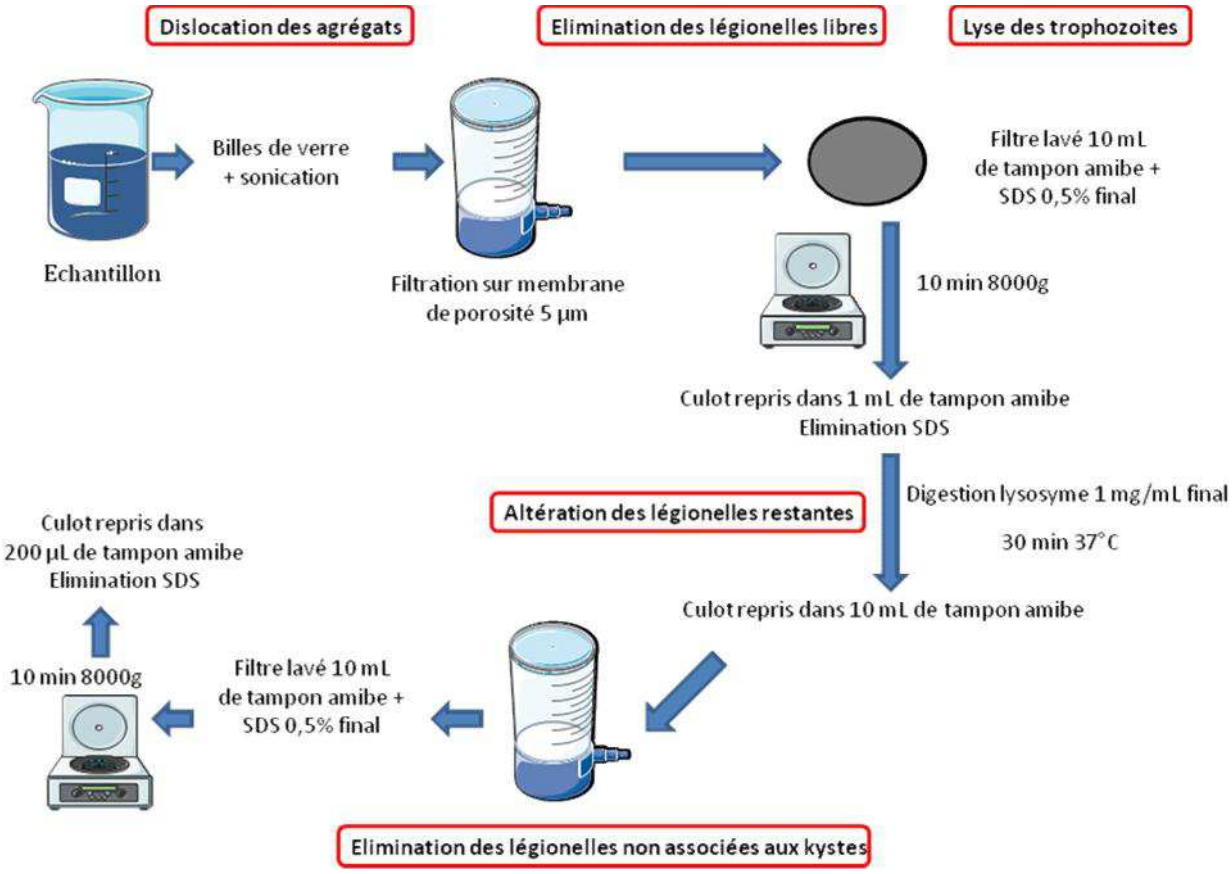


Figure 46 : Schéma du protocole final mis en place pour la séparation des légionelles totales et intra-kystes

Du fait qu'il n'a pas été possible de mettre au point un protocole fiable pour produire des kystes infectés, il a été décidé de tester le protocole sur des échantillons de kystes d'*Acanthamoeba* et de *Naegleria*. Le but est de collecter uniquement ces kystes à la fin du protocole pour pouvoir, en cas de présence de légionelles intra-kystes, les dénombrer dans cette fraction. Les résultats de ces essais Figure 47 sont représentés en log d'abattement de l'ADN dénombré par PCRq ce qui permet de visualiser directement l'efficacité du protocole sur les différents échantillons testés. Pour rappel, lors

de ces essais, un maximum d'abattement doit être atteint pour les échantillons de *Legionella* mais un minimum de perte des kystes doit être constaté.

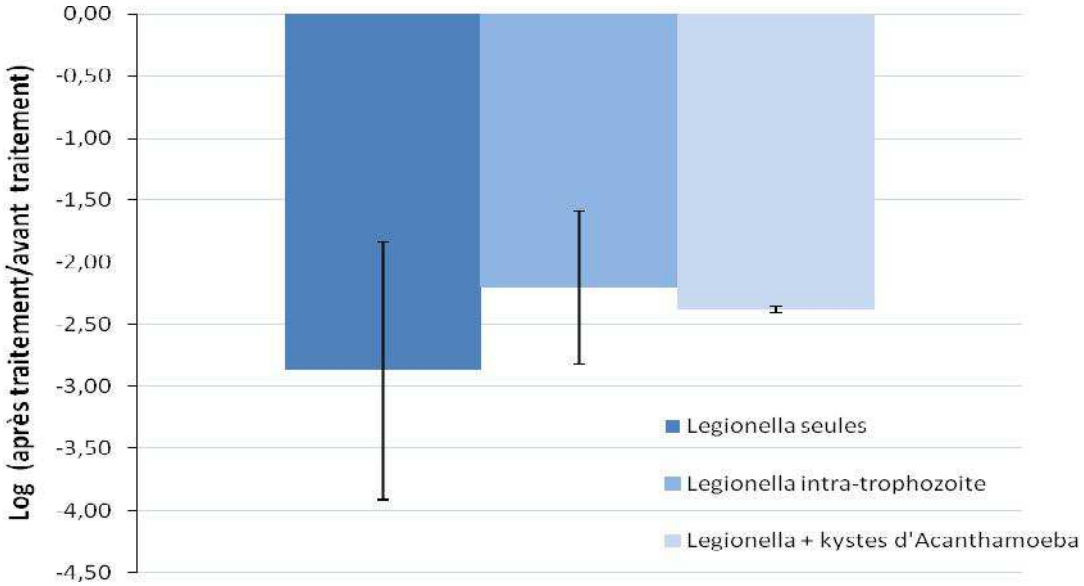


Figure 47 : Efficacité du traitement par le protocole de séparation de *Legionella* libres et intra-kystes sur *Legionella*

L'application du protocole sur les échantillons de *Legionella* (*Legionella* libres seules ou en présence de kystes d'*Acanthamoeba* et les *Legionella* intra-trophozoites) est relativement efficace. En moyenne, la quantification de l'ADN de *Legionella* à la fin du protocole est de 2 log inférieure à celle avant sa réalisation, Figure 47. Par contre, en ce qui concerne les kystes, les résultats sont moins en adéquation que ce qui était escompté, Figure 48. Pour *Acanthamoeba* (kystes seuls ou en présence de *Legionella*), en moyenne, seul 10% des kystes ont pu être récupérés après l'application du protocole. Le résultat est pire pour les kystes de *Naegleria* puisque 2,5 log de cellules ont été perdues, seuls 0,05%des kystes ont été récupérés après traitement. La différence entre les kystes des deux genres pourrait être due à la plus grande fragilité des kystes de *Naegleria* dont la structure et l'intégrité ont pu être altérées à la suite des traitements. La multiplication des différentes étapes pourraient expliquer la perte d'une partie des kystes d'*Acanthamoeba.* Les cellules ont peut-être été perdues lors des diverses manipulations.

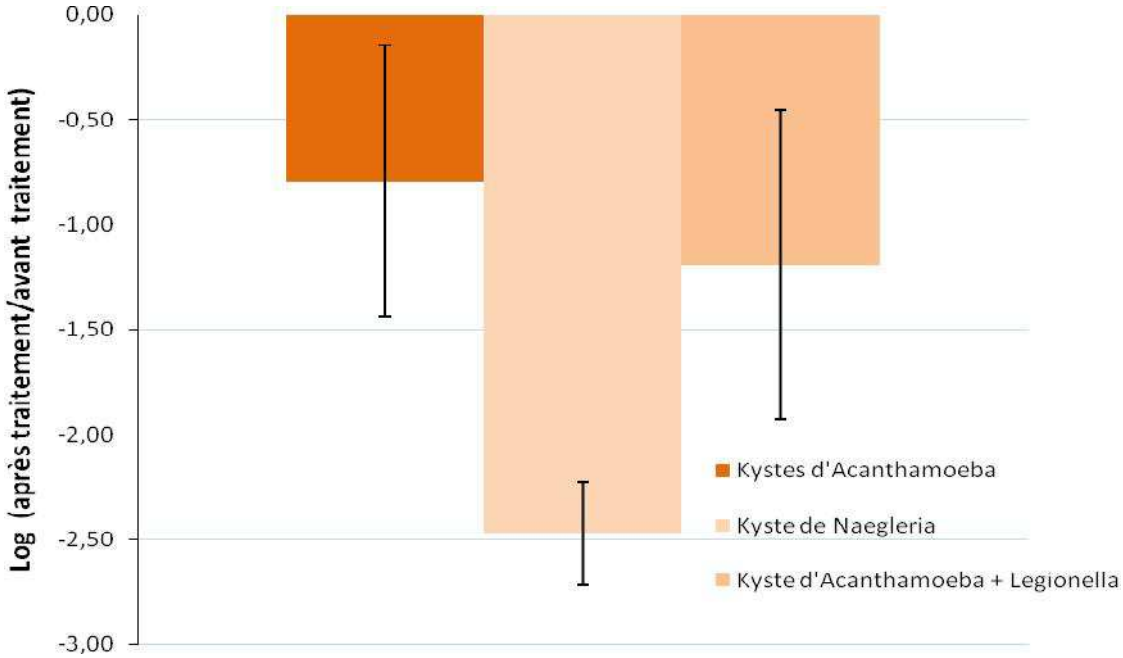


Figure 48 : Efficacité du traitement par le protocole de séparation de *Legionella* libres et intra-kystes sur les kystes amibiens

Au final, ce protocole ne peut être mis en œuvre en l'état malgré le fait que les étapes prises séparément n'aient pas montré d'effets délétères sur les kystes amibiens. Les kystes sont peut-être altérés en raison de la succession des différents traitements ou bien, ils sont perdus lors des différentes étapes de lavage et de centrifugation. La perte de ces kystes signifie que les *Legionella*, qu'ils peuvent potentiellement contenir, sont éliminées également. Malgré une bonne efficacité du protocole sur les *Legionella* libres et celles intra-trophozoites, cette perte rend le protocole inutilisable. Dans le but d'améliorer la récupération des kystes, des dénombrements des kystes après chaque étape sont à envisager pour identifier les étapes critiques du protocole et proposer des solutions adaptées.

10. Bilan et perspectives de la méthode de séparation

Dans notre étude, nous avons cherché à séparer les *Legionella* en fonction de leur association ou non avec les amibes mais aussi en fonction du type d'association avec les amibes à savoir intra-trophozoites et intra-kystes. De plus, nous souhaitons ne pas modifier l'échantillon initial, c'est pourquoi nous avons séparé l'échantillon en 2 parties dès le début, une partie pour quantifier les *Legionella* intra-amibiennes et les *Legionella* libres et une autre partie pour quantifier les *Legionella* intra-kystes, Figure 37.

Afin de séparer les *Legionella* libres et les *Legionella* intra-amibiennes, nous avons fait le choix de tester différentes méthodes afin de fixer les trophozoites et ainsi éviter leur lyse lors de la filtration. Au

final, après avoir testé différentes méthodes, nous avons choisi de mettre les micro-organismes dans une solution de Percoll à 20% avant la filtration, les autres techniques ne répondant pas au double objectif de rendre les trophozoites plus résistants à la filtration tout en permettant une quantification par PCRq. Les résultats obtenus sur les trophozoites d'*Acanthamoeba* sont positifs puisque qu'en moyenne, plus de la moitié de ces trophozoites est récupérée sur le filtre après la filtration. De plus, cette solution de Percoll à 20% n'entrave pas le passage des *Legionella* au travers du filtre. Néanmoins, la séparation amibes-légionelles par filtration s'est avérée délicate. De nouveaux tests avec des échantillons bien homogénéisés ou avec des concentrations en micro-organismes plus faibles sont à envisager afin de limiter d'éventuelles interactions physiques entre les deux micro-organismes qui pourraient entraver leur séparation lors de la filtration.

De plus, Lors de nos essais, nous avons cherché, en vain, à mettre en évidence la présence de *Legionella* intra-kystes. Le protocole testé pour isoler les kystes ainsi que leurs éventuelles *Legionella* s'est avéré complexe et, a certes permis d'éliminer plus de 2 log d'ADN des *Legionella* libres et intra-trophozoites mais a entraîné une perte (très importante pour *Naegleria*) des kystes. Pour améliorer cette récupération, il s'agira dans un premier temps d'identifier les étapes critiques engendrant la perte de ces kystes afin de simplifier ou modifier le protocole tout en conservant son efficacité sur l'ADN des *Legionella* libres et intra-trophozoites.

Dans la littérature, la présence et la quantification de *Legionella* dans divers environnements est avérée et déterminée (Arvand *et al.*, 2011; Borella *et al.*, 2004; Mouchtouri *et al.*, 2009) mais la proportion de *Legionella* intra et extracellulaires était jusqu'à lors non déterminée. Récemment, en 2012, Kao *et al.*, ont entrepris de faire le distinguo entre *Legionella* intracellulaires et *Legionella* extracellulaires. Pour ce faire, ils ont comparé différentes méthodes pour différencier les *Legionella* intracellulaires (intra-trophozoites et intra-kystes), de celles extracellulaires et ce pour des échantillons environnementaux, Figure 49 (Kao *et al.*, 2012).

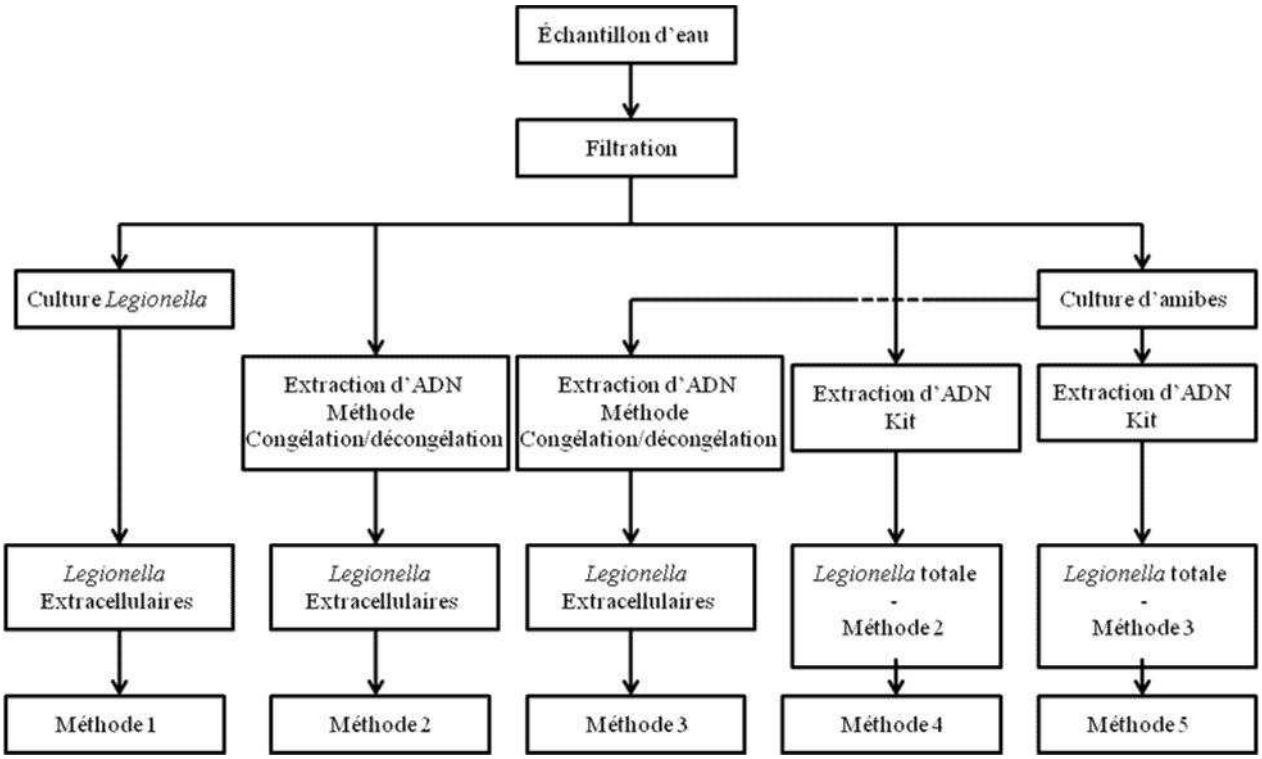


Figure 49 : Organigramme des 5 méthodes pour la détection de *Legionella* extra et intracellulaires d'après (Kao *et al.*, 2012)

La première étape avant la mise en œuvre des différentes méthodes a été d'effectuer une filtration sur membrane de porosité de 0,22 µm. Cette filtration a pour but de collecter l'ensemble des micro-organismes. Après avoir filtré leurs échantillons, Kao *et al.*, ont lavé ces filtres à l'aide de PBS. Ceci a été également le cas dans nos essais. Lors de leur étude, les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation 30 minutes à 2 600g. Dans notre cas, nous avons prélevé directement 200 µL dans les différents échantillons afin de réaliser l'extraction puis la quantification par PCRq. L'avantage de nos échantillons artificiels de laboratoire a été de pouvoir introduire des quantités de micro-organismes connues et suffisantes pour ne pas à avoir à réaliser de centrifugation évitant ainsi d'éventuelles pertes de cellules. Néanmoins pour des utilisations futures dans des échantillons environnementaux, l'ajout d'une étape de centrifugation afin de baisser la limite de quantification sera probablement nécessaire.

Afin de connaître la quantité de *Legionella* extra-cellulaires, Kao et *al.*, ont notamment utilisé une méthode originale qui consiste à extraire l'ADN après plusieurs cycles de congélation-décongélation en plaçant les cellules successivement dans de la carboglace puis dans de l'eau très chaude (80-90°C) (méthode 2 et 3). D'après Matsuo *et al.*, cette méthode est la méthode la plus facile pour libérer des bactéries intracellulaires et surtout, les kystes ne seraient pas lysés lors de cette étape (Matsuo *et al.*, 2008). Kao *et al.*, ont donc induit l'enkystement des trophozoites dans leur échantillon en plaçant les échantillons de 3 à 7 jours entre 0 et 4°C. Ce laps de temps peut paraître court pour obtenir des kystes matures et résistants. Par exemple, Coulon *et al.*, utilisent un protocole d'enkystement qui consiste à

placer les trophozoites dans du tampon Neff pendant une semaine (Coulon *et al.*, 2012) De plus, ce protocole ne s'avère pas être le meilleur pour produire les kystes les plus résistants. D'autres auteurs, Hughes et *al.*, ont auparavant indiqué que la méthode et la durée utilisée pour produire les kystes pouvait influencer la résistance de ces kystes (Hughes *et al.*, 2003). Pour les *Legionella* intracellulaires, Kao *et al.*, ont extrait l'ADN des *Legionella* puis réalisé une PCRq pour quantifier *Legionella* et ce avant et après culture des amibes libres (méthodes 4 et 5). Ils ont ensuite déterminé la proportion de *Legionella* intracellulaires en soustrayant à la quantification des *Legionella* totales celles des *Legionella* libres. Au final, lors de leur étude, le taux de détection, dans leurs échantillons, de *Legionella* spp. intracellulaires a été de 32% (16 échantillons sur 50) et celui de *Legionella* extracellulaires de 12% (6 échantillons sur 50) (Kao *et al.*, 2012).

L'absence à l'heure actuelle dans la littérature, de description de protocole permettant de séparer *Legionella* selon son état d'association (libre, intra-trophozoite et intra-kyste), souligne le côté innovant de notre étude. Cette absence de protocole, dans la littérature, est due à des verrous méthodologiques. Lors de notre étude, il est apparu difficile de mettre au point une technique qui permette de séparer *Legionella* en fonction de sont état d'association. Les étapes de mise en culture ou d'induction de l'enkystement des trophozoites peuvent entraîner des modifications de la proportion des différents types d'association. C'est pourquoi nous avons choisi de tester des méthodes basées sur une séparation physique. Lors de cette étude, nous avons testé différentes méthodes de séparation physique (gradient, immuno-capture, filtration) et mis en évidence que la filtration est la méthode la plus en adéquation pour la séparation de *Legionella* en fonction de son état d'association.

Le protocole développé puis testé ne permet pas, à ce jour, de réaliser correctement la séparation et demande des développements futurs. Néanmoins, nous avons mis en place une nouvelle méthode qui permet de limiter la lyse des trophozoites lors de la filtration. La fiabilité de cette méthode est à confirmer avec *Naegleria* et ce protocole est à tester avec d'autres genres amibiens. Elle pourrait être utilisée pour d'autres applications. Nous avons également mis en place un protocole qui permet d'éliminer efficacement l'ADN des légionelles libres et intra-trophozoites, mais il est à améliorer pour collecter les kystes et ainsi pouvoir dénombrer d'éventuelles *Legionella* intra-kystes et pouvoir statuer sur leur présence ou absence dans les kystes.

TRAITEMENTS CHIMIQUES

La thématique de désinfection (légionelles et amibes) a été initiée en amont de la thèse et s'est poursuivie au cours de la thèse. Elle a fait l'objet de 2 publications distinctes :

- **Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*** (Dupuy *et al.*, 2011), water research 2011 (1087-1094), Annexe 5
- **Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants** (Dupuy *et al.*, 2013), Int. J. Hyg. Environ. Health (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007, Annexe 6

L'objectif de la première étude a été de comparer l'efficacité de 3 biocides oxydants (le chlore, la monochloramine et le dioxyde de chlore) sur des amibes, des *Legionella* libres et des *Legionella* intra-trophozoites. Un suivi des concentrations microbiennes et un suivi du résiduel du biocide ont été effectués durant les traitements. Ces suivis ont permis de déterminer les $Ct_{99,9\%}$, et ainsi de comparer la sensibilité des micro-organismes aux différents biocides. Les résultats ont montré des différences de sensibilité entre les différentes souches d'*Acanthamoeba* testées. La souche V1 s'est avérée la moins sensible. Les trophozoites ont présenté un $Ct_{99,9\%}$ allant de 60 à 100 mg.min/L pour le chlore, 5 à 25 mg.min/L pour la monochloramine et un $Ct_{99,9\%}$ supérieur à 5 mg.min/L pour le dioxyde de chlore (expériences réalisées à 30°C). De plus, alors que le chlore et le dioxyde de chlore ont été moins efficaces vis-à-vis des *Legionella* intra-trophozoites par rapport à des *Legionella* libres, la monochloramine a présenté une efficacité similaire ($Ct_{99,9\%}$ compris entre 5 et 25 mg.min/L). Nous avons alors émis l'hypothèse d'un mode d'action différent pour la monochloramine.

L'objectif de la seconde étude a été de comparer la sensibilité de kystes et de trophozoites appartenant aux genres *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella* à 3 biocides oxydants : le chlore, la monochloramine et le dioxyde de chlore. Comme pour la première étude, un suivi des concentrations microbiennes et un suivi du résiduel du biocide ont été effectués durant les traitements. Ces suivis ont été effectués selon la même méthodologie. Dans nos conditions de traitements, la comparaison de l'efficacité intrinsèque des biocides a montré que le dioxyde de chlore est le biocide le plus efficace ($Ct_{99\%}$ le plus faible). Les kystes d'*Acanthamoeba* sont apparus bien plus résistants que les trophozoites notamment pour le chlore et la monochloramine, d'un facteur 30 et 44 respectivement. Ceux du genre *Naegleria* et *Hartmannella* sont apparus un peu plus résistants que les trophozoites pour le chlore et dans une moindre mesure pour la monochloramine : d'un facteur 4 et 3 respectivement. De façon globale, les kystes d'*Acanthamoeba* sont bien moins sensibles que ceux des

autres genres testés, la composition particulière de la paroi de ces kystes pourrait être responsable de cette différence de sensibilité.

11. Objectifs des traitements

Dans le cadre de cette étude, seule la monochloramine a été utilisée pour évaluer son efficacité sur des bactéries dans différentes conditions physiologiques et dans différents eaux. Initialement la méthode de séparation, développée en amont de ces essais, devait être utilisée pour comparer la sensibilité des légionelles libres et intra-amibiennes (trophozoites et kystes) en eau brute. Les difficultés techniques ont orienté les recherches vers une comparaison de la sensibilité de *Legionella* en fonction de son état physiologique (phase exponentielle, stationnaire, après passage dans les amibes). En effet, l'état physiologique dans lequel se trouve la bactérie a également un rôle; par exemple, Ayyildiz *et al.* indiquent que les bactéries en phase stationnaire prolongée seraient plus difficiles à éliminer que les bactéries en phase exponentielle de croissance (Ayyildiz *et al.*, 2009). Dans l'environnement, *Legionella* se multiplie dans des hôtes tels que les amibes et persiste ensuite de longues périodes dans les biofilms. Elle pourrait également se multiplier de façon limitée dans ces biofilms lorsque les conditions du milieu sont favorables (Taylor *et al.*, 2013; Wingender and Flemming, 2011). Il est donc intéressant de déterminer la sensibilité de ces *Legionella* qui sont dans des états physiologiques différents. De plus, dans la littérature, les seules valeurs de Ct de *Legionella* pour la monochloramine ont été obtenues pour des cellules cultivées sur milieu gélosé (Cunliffe, 1990; Dupuy *et al.*, 2011; Jakubek *et al.*, 2013a).

Il a également été décidé de comparer l'efficacité de désinfection en eaux de rivières afin de déterminer si la matrice a un impact sur la sensibilité de désinfection de *Legionella*. Le but de ces deux types d'essais est de mieux connaître les sensibilités de *Legionella* sous ces différentes formes et d'évaluer les éventuels effets de protection des eaux brutes.

12. Effet Physiologique, traitement en tampon phosphate

La comparaison de la sensibilité de *Legionella* dans différentes phases physiologiques a été effectuée avec les souches *L. pneumophila* Lens et *L. pneumophila* QEE 6945, toutes deux appartenant au sérogroupe 1. Des cultures liquides en BYE ont été réalisées et d'après la Figure 50, la phase exponentielle de croissance est comprise entre 7 heures et 28 heures de croissance (DO_{595} comprise entre 0,3 et 2,5) tandis que la phase stationnaire de croissance débute après ces 28 heures. Pour cette étude, des cellules en phase exponentielle (DO_{595nm} comprise entre 0,4 et 0,8) et des cellules en phase stationnaire (t 72 heures, DO_{600nm} supérieure à 2) ont été utilisées. La Figure 50 ne présente que le suivi pour la souche Lens, la croissance de la souche QEE 6945 est similaire (donnée non montrée).

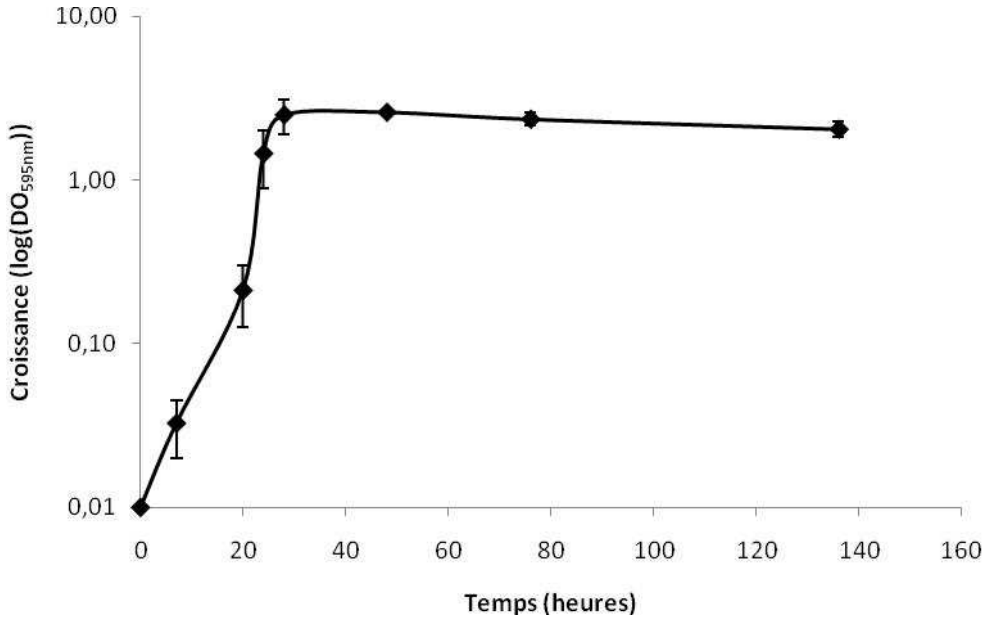


Figure 50 : Croissance de *L. pneumophila* Lens. Le suivi de croissance est réalisé par mesure de la DO à 595 nm pendant 142 heures. L'inoculum de départ est fixé à 10^7 UFC/ml.

Pour les *Legionella* intra-amibiennes, les cellules ont été récupérées après 24, 48 ou 72 heures de co-culture à MOI 0,1 et à la température de 30°C. Le choix des temps 24, 48 et 72 heures a été effectué à partir des résultats obtenus dans le chapitre co-culture. Ces trois temps couvrent les différentes étapes de la prolifération dans les amibes. Les traitements ont été réalisés dans un tampon phosphate à pH 8, à 30°C à l'aide d'une dose initiale en monochloramine de 0,8 mg/L équivalent Cl_2. Le pH et la température ont été choisis pour se rapprocher des conditions relevées dans les circuits de refroidissement et les réseaux. La concentration initiale en monochloramine a également été choisie pour être relativement proche des concentrations mises en œuvre sur les circuits d'EDF (résiduel à 0,25 mg/L équivalent Cl_2), tout en permettant un suivi de l'effet de la monochloramine sur les micro-organismes ainsi qu'un suivi de l'évolution de la concentration en monochloramine jusqu'à plus d'une heure après le début du traitement.

Un suivi microbien par dénombrement des UFC sur milieu gélosé GVPC, et un suivi chimique par dosage du résiduel de monochloramine par méthode normalisée NF EN ISO 7393-2 ont été effectués pendant les traitements afin de déterminer les $Ct_{99,9\%}$ des différentes phases. Les essais ont été menés en triplicat. Des témoins *Legionella* sans traitement ont également été réalisés lors de chaque traitement, afin de vérifier l'absence de perte de cultivabilité des cellules dans le tampon. Des témoins tampon phosphate seul, sans *Legionella*, ont été préparés pour suivre le résiduel de monochloramine et ainsi vérifier l'absence de consommation du biocide par ce tampon. Les suivis des résiduels de monochloramine dans le tampon phosphate seul n'ont pas indiqué de consommation du biocide par ce tampon, Figure 51. L'utilisation de ce tampon n'entraîne donc pas de demande en monochloramine.

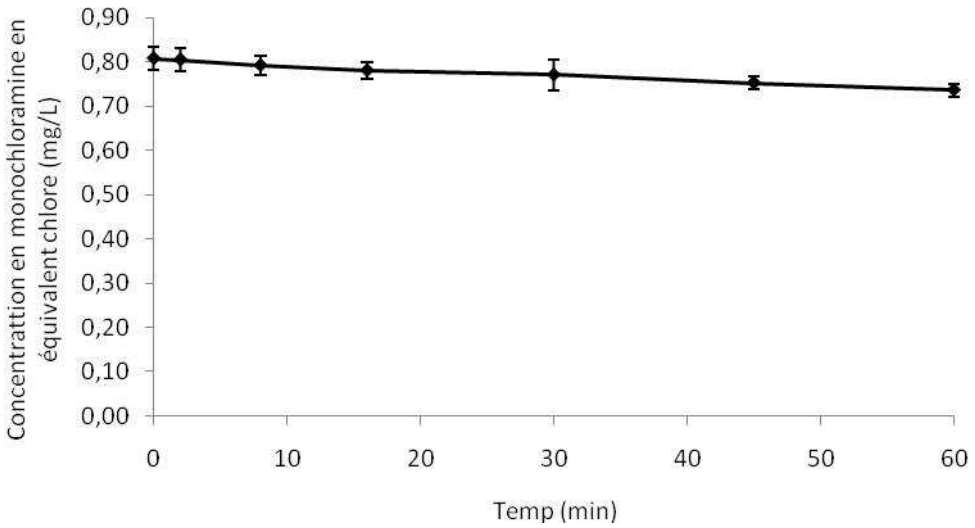


Figure 51 : Suivi du résiduel de monochloramine dans les témoins tampon phosphate seul

Par ailleurs, le principe du protocole mis en œuvre est résumé, Figure 52. Le détail de la méthodologie de traitement est fourni dans le paragraphe 9.3 du matériel et méthodes.

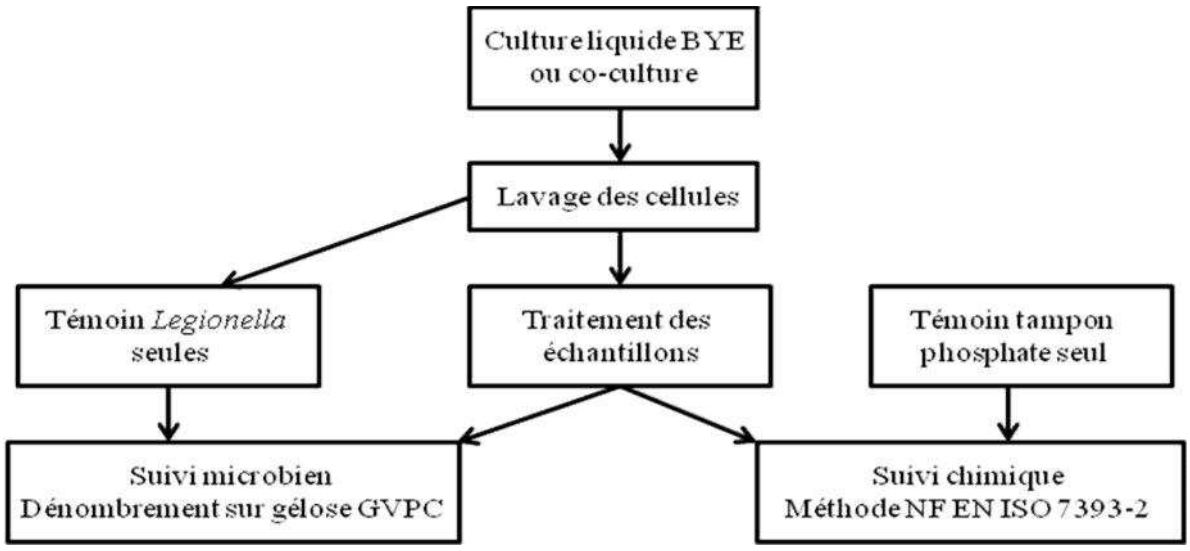


Figure 52 : Organigramme du principe du protocole suivi lors des traitements de *Legionella* à la monochloramine

12.1. Traitements en phase exponentielle et en phase stationnaire

Après introduction des légionelles en phase exponentielle ou stationnaire dans le tampon et ajout de la monochloramine, le suivi des réductions de concentrations en *Legionella* dans le temps permet de comparer l'efficacité du traitement sur ces deux phases physiologiques, et ce, pour les deux *L. pneumophila* testée, Figure 53. Les témoins *Legionella* seules, n'ont pas présenté de perte de cultivabilité dans le tampon phosphate lors de la durée du traitement, Tableau 23.

Tableau 23 : Variation des concentrations en *Legionella,* issues de culture en BYE, après 30 ou 60 minutes dans les erlens témoins sans traitement

	L. pneumophila Lens		*L. pneumophila* QEE 6945	
	Phase exponentielle	Phase stationnaire	Phase exponentielle	Phase stationnaire
log (N/N_0)	**0,1 ± 0,4**	**- 0,1 ± 0,1**	**0,1 ± 0,1**	**0,1 ± 0,2**

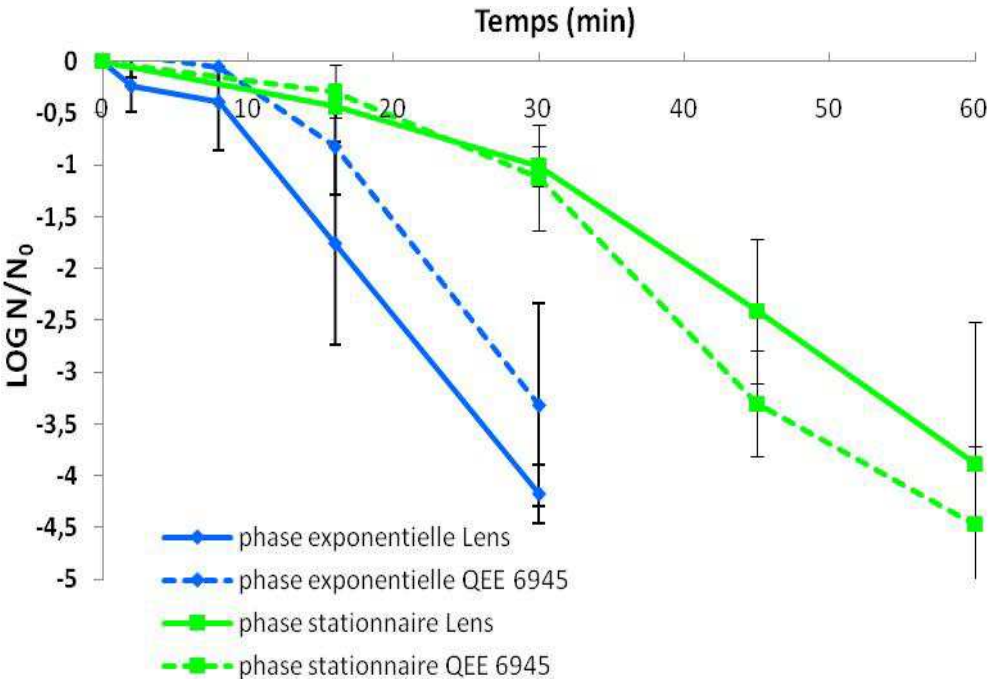


Figure 53 : Réduction de la cultivabilité de *L. pneumophila* Lens et QEE 6945, en fonction de la phase de croissance, après traitement à la monochloramine

La comparaison des deux souches de *L. pneumophila* indique des sensibilités proches, Figure 53. Pour les deux souches, après 30 minutes de contact avec la monochloramine, la réduction de cultivabilité est supérieure à 3 log pour les cellules en phase exponentielle alors qu'au même temps pour les cellules en phase stationnaire, la réduction n'est que d'1 log. Pour les phases stationnaires, les 3 log d'abattement sont atteints entre 30 et 45 minutes de contact avec la monochloramine pour la souche QEE 6945 et même seulement après 45 minutes pour la souche Lens. De plus, il peut être observé une phase plateau au début du traitement. La réduction de cultivabilité est limitée, lors des 8 premières minutes de traitement pour les cellules en phase exponentielle. Pour les cellules en phase stationnaire, la réduction de cultivabilité après 16 minutes reste limitée (inférieure à 0,5 log). Après cette phase de plateau la réduction de la cultivabilité s'accélère.

Les $Ct_{99,9\%}$ correspondants ont été déterminés par calcul à partir des résiduels de monochloramine mesurés lors des différents temps de prélèvement de chaque traitement. A partir de ces valeurs une

extrapolation a été faite grâce aux équations de réduction de viabilité, en effet, la réduction de cultivabilité s'avère linaire en fonction du Ct (R^2 proche de 1), Tableau 24. Pour ce faire, pour chaque condition, 3 équations ont été déterminées :

- Une correspondant à la moyenne des trois essais
- Une correspondant à la moyenne de réduction de cultivabilité moins l'écart-type
- Une dernière correspondant à la moyenne de réduction de cultivabilité additionnée de l'écart-type.

Les deux dernières équations ont permis de déterminer une moyenne et un écart-type pour chaque $Ct_{99,9\%}$.

Tableau 24 : Estimation des valeurs $Ct_{99,9\%}$ des deux souches de *Legionella* testées, en fonction de la phase physiologique

	Souche	Equation de droite	R^2	Estimation $Ct_{99,9\%}$
Phase exponentielle	Lens	y= - 0,1861x+0,2668	R_2 = 0,96	**15,9 ± 1,3**
	QEE 6945	y= - 0,1408x+0,4358	R_2 = 0,90	**22,6 ± 8,9**
Phase stationnaire	Lens	y= - 0,0871x+0,0406	R_2 = 0,91	**38,4 ± 18,9**
	QEE 6945	y= - 0,0972x+0,5856	R_2 = 0,92	**31 ± 6,5**

Pour la phase exponentielle, le $Ct_{99,9\%}$ est ainsi estimé à 15,9 ± 1,3 mg.min/L pour la souche Lens et 22,6 ± 8,9 mg.min/L pour la souche QEE 6945. Pour la phase stationnaire, le $Ct_{99,9\%}$ est estimé à 38,4 ± 18,9 mg.min/L pour la souche Lens et 31 ± 6,5 mg.min/L pour la souche QEE 6945. Dans la littérature il est fourni seulement la sensibilité, à la monochloramine, de *L. pneumophila* issues de culture sur milieu gélosé. Récemment Jakubek *et al.*, ont déterminé le $Ct_{99,9\%}$ de différentes souches de *Legionella* de référence et issues de circuits de refroidissement. Lors de leurs essais, pour des *Legionella* cultivées sur gélose, et après traitement à la monochloramine à pH 7,5-8,5 et à une température de 25°C-35°C, la majorité des souches a présenté un $Ct_{99,9\%}$ compris entre 20 et 30 mg.min/L (Jakubek *et al.*, 2013a). D'autres auteurs, Cunliffe *et al.*, avaient estimé auparavant le $Ct_{99\%}$ de *L. pneumophila* issues de culture sur milieu gélosé à 15 mg.min/L (30°C, pH 8,4-8,6) (Cunliffe, 1990). Lors de l'étude précédemment réalisée, nous avions déterminé la sensibilité de *L. pneumophila* Lens issues également de culture sur milieu gélosé (Dupuy *et al.*, 2011). Le $Ct_{99,9\%}$ à pH 8 et 30°C avait été déterminé à environ 25 mg.min/L. Lors des cultures sur milieux gélosé, il est difficile de déterminer la phase physiologique à contrario d'une culture liquide ou la population de bactéries présente une croissance homogène. Lors de ces essais, bien que les conditions de culture de *Legionella* soient différentes (culture en milieu liquide et non sur milieu gélosé) et qu'il soit difficile

d'appréhender l'état physiologique de bactéries sur milieu gélosé, nos résultats de $Ct_{99,9\%}$ sont proches de ceux obtenus par ces auteurs.

Dans la littérature, les *Legionella* en phase exponentielle sont décrites comme moins résistantes aux stress que celles en phase stationnaire (Steinert *et al.*, 2002). Les *L. pneumophila* en phase stationnaire, en plus d'être plus résistantes et de posséder une paroi plus épaisse, ont une expression génétique et protéique modifiée (Swanson and Hammer, 2000). La moins grande sensibilité des *Legionella* en phase stationnaire est également clairement mise en évidence avec la monochloramine, lors de ces essais. On note un facteur de presque 2 entre les $Ct_{99,9\%}$ calculés. Bien que le mode d'action de la monochloramine soit encore mal connu, l'action de la monochloramine, d'après Lechevallier *et al.*, porterait sur les protéines membranaires (LeChevallier and Au, 2004). De plus, d'après Mogoa *et al.*, la monochloramine pourrait induire des modifications de la membrane chez des trophozoites appartenant au genre *Acanthamoeba* (Mogoa *et al.*, 2011). D'après ces auteurs, la monochloramine agirait sur des protéines associées à des mécanismes cellulaires. La comparaison de la composition membranaire de *Legionella* entre la phase exponentielle et la phase stationnaire, par Verdon *et al.*, a montré que la membrane des cellules en phase stationnaire est plus fluide : les chaînes d'acides gras sont moins longues (inférieures à 16 carbone) et ces acides gras sont également plus souvent branchés par rapport à la phase exponentielle (Verdon *et al.*, 2011). Pour Sutherland, les bactéries plus âgées sont plus difficiles à éliminer que celles qui sont plus jeunes car leur paroi est composée d'une couche de polysaccharides plus épaisse ce qui leur permet d'être moins sensibles à la désinfection (Sutherland, 2001). Les modifications dans la composition de la paroi entre ces deux phases physiologiques pourraient, au moins en partie, expliquer les différences de sensibilité, à la monochloramine.

En outre, des mécanismes de régulations génétiques ou protéiques pourraient également expliquer ces différences. Une étude récente de Berry *et al.*, a comparé la réponse du transcriptome d'*E. coli* traitée à la monochloramine (Berry *et al.*, 2010). Lors de cette étude, le traitement à la monochloramine a induit des modifications de l'expression de divers gènes. L'expression de ces gènes est également modifiée lors d'autres types de stress (autres oxydants, chaleur, froid, variation de pression osmotique, acide). Il serait alors intéressant d'étudier la réponse transcriptomique d'un traitement à la monochloramine de *L. pneumophila* en phase stationnaire et exponentielle. Ceci, afin de comparer la réponse au stress induit par la monochloramine sur ces deux phases physiologiques et essayer d'identifier des facteurs pouvant expliquer la différence de sensibilité.

Finalement en absence de la connaissance du mode d'action précis de la monochloramine, il est difficile d'identifier le ou les facteurs responsables de la différence de sensibilité entre les deux phases

physiologiques. Des tests visant à déterminer le mode d'action précis de la monochloramine permettraient de mieux comprendre ces différences.

12.2.Traitements des co-cultures

Les *Legionella* issues de co-cultures 24, 48 et 72 heures ont été traitées après avoir lysé les trophozoites par des lavages et par des cycles de centrifugation. Le fait de libérer les *Legionella* des amibes a permis d'effectuer les traitements de façon identiques entre les *Legionella* issues de co-cultures, puisque qu'après 24 heures de co-culture, les *Legionella* sont intracellulaires alors qu'après 72 heures, les *Legionella* ont entraîné la lyse des amibes et sont libérées dans le milieu. Comme, lors des traitements des *Legionella* issues de culture en BYE, les témoins *Legionella* seules n'ont pas présenté de perte de cultivabilité dans le tampon phosphate lors de la durée du traitement, Tableau 25.

Tableau 25 : Variation des concentrations en *Legionella*, issues de co-culture, après 30 ou 60 minutes dans les erlens témoins sans traitement

	L. pneumophila Lens			*L. pneumophila* QEE 6945		
	Co-culture 24 heures	Co-culture 48 heures	Co-culture 72 heures	Co-culture 24 heures	Co-culture 48 heures	Co-culture 72 heures
log (N/N_0)	**0,0 ± 0,2**	**0,2 ± 0,2**	**- 0,1 ± 0,2**	**- 0,1 ± 0,2**	**0,2 ± 0,2**	**0,1 ± 0,1**

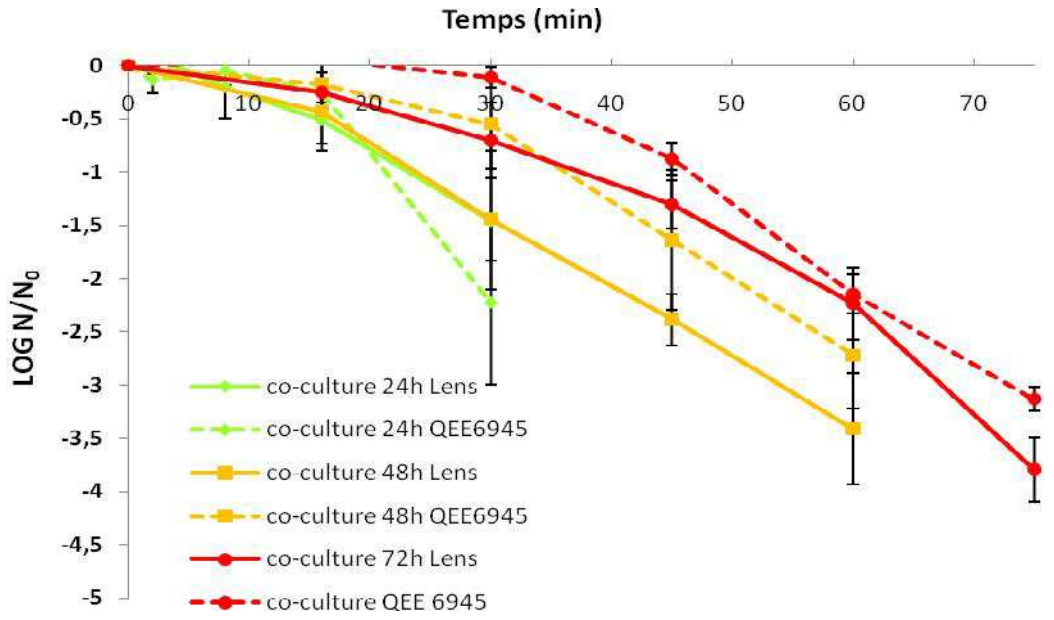


Figure 54 : Réduction de cultivabilité de *L. pneumophila* Lens et QEE 6945 issues de différents temps de co-cultures, après traitement à la monochloramine

La sensibilité à la monochloramine des deux souches testées est relativement proche, Figure 54 comme c'était le cas pour les phases exponentielle et stationnaire. Une petite différence est toute fois observable pour les co-cultures à 48 heures où la souche QEE 6945 présente une sensibilité un peu moins importante que la souche Lens. Il convient de noter que lors des traitements des co-cultures 24 heures, la méthodologie utilisée n'a pas permis de visualiser plus de 2 log de réduction de cultivabilité puisque la prolifération des *Legionella* n'a pas été suffisante pour effectuer les traitements à la concentration de 10^8 cellules/L.

La réduction de cultivabilité des *Legionella* apparaît dépendante de la durée de la co-culture. En effet, alors que pour les cellules issues des co-cultures 24 heures, la réduction d'1 log de la cultivabilité est effective après 16 minutes, cette réduction n'est effective qu'après 45 minutes pour les cellules issues des co-cultures 72 heures. Les co-cultures 48 heures présentent une sensibilité intermédiaire. *Legionella* présente un cycle de vie biphasique décrit par Molofsky *et al.* (Molofsky and Swanson, 2004). Les *Legionella* qui se sont multipliées dans les amibes ont une expression protéique et génétique modifiée (Swanson and Hammer, 2000) et sont décrites comme plus résistantes au stress. Elles présentent également une paroi plus épaisse (Steinert *et al.*, 2002). Les différences de sensibilité à la monochloramine entre les cellules issues de différents temps de co-culture pourraient s'expliquer par le fait que les cellules ne sont pas au même stade physiologique lors des différents temps. Lors des tests de multiplication de *L. pneumophila* Lens et QEE 6945 dans les amibes, le suivi des concentrations en *Legionella* a montré que la prolifération est initiée qu'après 24 heures. Les cellules traitées après 24 heures de co-culture sont probablement en phase réplicative comme les cellules exponentielles lors des cultures en milieu liquide. Par contre, celles collectées après 72 heures sont probablement en phase transmissive et expriment un phénotype de résistance aux stress plus important comme c'est le cas des cellules en phase stationnaire lors des cultures en milieu liquide. En fait, les cellules en phase exponentielle miment la phase réplicative et les cellules en phases stationnaires miment la phase transmissive. Par ailleurs, les cellules en phase transmissive expriment différents anti-oxydants qui pourraient permettre à la cellule de limiter les effets des radicaux libres (anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle $OH^{\bullet}$) générés par l'oxydation engendrée par le traitement. Pour les cellules issues de 48 heures de co-culture, leur sensibilité intermédiaire pourrait être due au fait qu'une partie des *Legionella* est en phase réplicative alors qu'une autre partie est déjà en phase transmissive, les cellules ne sont pas synchrones.

12.3. Comparaison de la sensibilité de *L. pneumophila* Lens en fonction de la phase physiologique associée ou non aux amibes.

Afin de comparer les sensibilités des *L. pneumophila* Lens, traitées sous les différentes phases physiologiques, associées ou non aux amibes, le Tableau 26 présente les valeurs de $Ct_{90\%}$ et $Ct_{99,9\%}$.

Les calculs ont été effectués de la même façon que pour la détermination des $Ct_{99,9\%}$ des deux souches de *Legionella* lors de la comparaison de leur sensibilité en phase exponentielle et stationnaire, paragraphe précédent. Le comportement des deux souches testées étant proches, la comparaison du Tableau 26 n'est présentée que pour la souche Lens. Une exception à cette constatation peut tout de même être notée, pour les cellules après 48 heures de co-culture, le $Ct_{90\%}$ est estimée 17,7 ± 5,5 mg.min/L pour la souche QEE 6945, et 12,7 ± 2,0 mg.min/L pour la souche Lens. De plus, afin de tenir compte de la phase plateau observée en début de traitement pour les cellules stationnaires et les cellules issues de 72 heures de co-culture, le $Ct_{90\%}$ pour ces cellules a été calculé à partir d'une équation de droite définie avec les premiers points du traitement. Par ailleurs, pour les cellules issues de co-culture 24 heures, la valeur du $Ct_{99,9\%}$ n'a pu être déterminée car la quantité de cellules n'a pas été suffisante pour pouvoir observer 3 log de réduction de cultivabilité.

Tableau 26 : Estimation des valeurs de $Ct_{90\%}$ et $Ct_{99,9\%}$ de *Legionella* Lens en fonction de la phase physiologique, associée ou non aux amibes

	Equation de droite	R^2	Estimation $Ct_{90\%}$	Estimation $Ct_{99,9\%}$
Phase exponentielle	y= - 0,1861x+0,2668	R_2 = 0,96	**5,1 ± 0,2**	**15,9 ± 1,3**
Phase stationnaire	y= - 0,0422x+0,0347 y= - 0,0871x+0,4601	R_2 = 0,99 R_2 = 0,91	**22,7 ± 3,9**	**38,4 ± 18,9**
Co-culture 24h	y= - 0,0635x-0,1568	R_2 = 0,99	**18,0 ± 9,3**	**ND***
Co-culture 48h	y= - 0,0778x+0,2662	R_2 = 0,98	**12,7 ± 2,0**	**38,8 ± 6,1**
Co-culture 72h	y= -0,0376x+0,1039 y= - 0,0645x-0,4812	R_2 = 0,96 R_2 = 0,96	**28,0 ± 9,2**	**46,5 ± 6,2**

*ND : non déterminé

Les cellules en phase exponentielle sont les plus sensibles. Les valeurs de $Ct_{99,9\%}$ (15,9 ± 1,3 mg.min/L) sont les plus faibles. A l'opposé les valeurs les plus élevées sont retrouvées pour les cellules en phase stationnaire (38,4 ± 18,9 mg.min/L) et les cellules issues de 72 heures de co-culture (46,5 ± 6,2 mg.min/L). Malgré un écart-type important pour le $Ct_{99,9\%}$ des cellules stationnaires, les cellules issues de 72 heures de co-culture semblent un peu moins sensible. Les Figure 53 et Figure 54 confortent cette observation. A dose équivalente de monochloramine, la réduction de cultivabilité est plus rapide pour les cellules en phase stationnaire : les 3 log de réduction sont atteints entre 45 et 60 minutes de traitements, alors que ces 3 log sont atteints entre 60 et 75 minutes de traitements pour les cellules issues de 72 heures de co-culture. Quant aux cellules issues de 48 heures de co-culture, elles présentent une sensibilité inférieure à celle issues de 72 heures de co-culture ($Ct_{99,9\%}$ = 39,8 ± 6,1 mg.min/L).

De plus la valeur de $Ct_{99,9\%}$ (15,9 ± 1,3 mg.min/L) des cellules en phase exponentielle est du même ordre que les valeurs de $Ct_{90\%}$ des cellules issue des co-cultures 24 et 48 heures (18 ± 9,3 mg.min/L et 12,7 ± 2,0 mg.min/L, respectivement) soulignant la sensibilité des cellules en phase de multiplication. La comparaison du $Ct_{90\%}$ montre une sensibilité pour les cellules des co-cultures 24 et 48 heures du même ordre. Pour rappel, les résultats des essais de multiplication de *L. pneumophila* dans les amibes ont montré que la souche Lens initie ou est en phase de multiplication pour ces deux temps. Néanmoins à 48 heures, une partie des *Legionella* s'est déjà multipliée puisque la population de légionelles augmente entre 24 et 48 heures. Il n'est donc pas surprenant d'obtenir un $Ct_{90\%}$ du même ordre. Par contre la comparaison du $Ct_{99,9\%}$ entre des cellules issues de 24 et 48 heures aurait pu nous indiquer si une partie des cellules (celles qui se sont déjà multipliées) est moins sensible après 48 heures de co-culture. Au final ce sont vraisemblablement les cellules issues de 72 heures de co-culture les moins sensibles au traitement.

Le passage au sein des amibes pourrait expliquer pourquoi les *Legionella* issues de co-culture sont moins sensibles que celles issues de culture en milieu liquide. En effet, il semblerait que *Legionella*, après passage dans les amibes, acquière des caractères de résistance et de virulence plus importants que lors d'une multiplication extracellulaire (cellules en phases exponentielles et stationnaires). Une augmentation de la résistance, après passage dans les amibes, aux antibiotiques mais également à trois biocides organiques est décrite par Barker *et al.* (Barker *et al.*, 1992; Barker *et al.*, 1995). D'autres auteurs, Kwaik *et al.*, ont constaté une tolérance au chlore ainsi qu'à d'autres stress (choc osmotique, choc thermique, stress oxydatif…) meilleure pour des *L. pneumophila* après infection d'un hôte amibien (Abu Kwaik *et al.*, 1997). La différence de sensibilité pourrait être due en partie à une adaptation phénotypique puisque selon Kutcha *et al.*, et Chang *et al.*, les conditions de croissance défavorables (carences nutritionnelles, variation de pH..) induisent chez les légionelles des adaptations phénotypiques permettant une tolérance au chlore (Chang *et al.*, 2007; Kuchta *et al.*, 1985). La prolifération dans les amibes pourrait, d'après Chang *et al.*, induire un stress pour *Legionella* (Chang *et al.*, 2009).

Au final, lors de nos essais, les *Legionella* issues de co-culture ont présenté une moindre sensibilité à la monochloramine : on observe en effet un facteur de 2,4 entre le $Ct_{99,9\%}$ des cellules en phase exponentielle et celui des cellules issues de 48 heures de co-culture. Les cellules post-amibe, après 72 heures de co-culture, semblent également un peu moins sensibles que les cellules en phase stationnaire (facteur 1,2 observé entre les Ct respectifs et réduction de la cultivabilité plus rapide). Ces résultats semblent confirmer que ces bactéries issues du passage dans les amibes présentent une meilleure résistance aux stress.

13. Effet matrice

Les essais sur l'effet de la matrice de l'eau sur l'efficacité de désinfection ont été réalisés sur des *Legionella* en phase exponentielle et en phase stationnaire. Pour ce faire, ces cellules ont été introduites dans trois eaux de rivières différentes (Vienne, Loire et Moselle) et ce, soit dans l'eau brute, soit dans ces mêmes eaux filtrées sur membrane de porosité 0,45 µm ou enrichies en MES par ajout dans 100 mL d'eau des MES collectées après filtration d'un litre d'eau brute. Les cellules, mises en contact avec ces eaux une heure avant le début des traitements, ont ensuite été traitées de façon identique aux essais en tampon phosphate (30°C, 0,8 mg/L équivalent Cl_2 de monochloramine). Notre choix s'est porté sur un temps de mise en contact préalable d'une heure afin de tenter d'initier une interaction avec les MES tout en limitant la possibilité de changement physiologique chez la bactérie lors du passage d'un milieu de culture riche à une eau de rivière. Les $Ct_{99,9\%}$ ont ensuite été déterminés pour pouvoir comparer les traitements. Les essais ont été menés en triplicat. Des témoins *Legionella* sans traitement ont également été réalisés lors de chaque traitement, afin de vérifier l'absence de perte de cultivabilité des cellules dans les différentes eaux.

13.1. Comparaison des trois eaux de rivières

13.1.1. Analyse physico-chimique

Afin de formuler des hypothèses concernant les éventuelles différences de sensibilité de *Legionella* dans les eaux de Loire et de Vienne, une analyse de divers paramètres physico-chimiques a été faite, Tableau 27.

Tableau 27 : Caractéristiques physico-chimiques des eaux de rivières Loire, Vienne et Moselle

	Loire	Vienne	Moselle
pH	7,58	7,12	7,71
conductivité à 20 °C (µS/cm)	272	226	1710
MES (mg/l)	20,2	8,5	12,8
MVS (mg/l)	14	6,5	ND*
MVS (%)	71	77	ND*
COT (mg C/l)	4,79	6,70	3,12
COD (mg C/l)	4,76	6,24	3,03
UV_{254nm} (5 cm)	0,73	1,25	0,39
SUVA (l/mg C/m)	3,06	4,02	2,55
HCO_3^- (mg/l)	104,9	78,1	144,0
Cl^- (mg/l)	17,5	14,5	437,8
NO_3^- (mg/l)	10,6	6,8	9,0
SO_4^{2-} (mg/l)	14,6	12,2	87,9
Na^+ (mg/l)	12,0	28,0	122,0
K^+ (mg/l)	4,8	3,1	8,1
Ca^{2+} (mg/l)	35,2	16,4	196
Mg^{2+} (mg/l)	3,1	3,6	12,5
HCO_3^- (°F)	8,6	6,4	11,8
Cl^- (°F)	2,5	2,0	61,7
NO_3^- (°F)	0,9	0,6	0,7
SO_4^{2-} (°F)	1,5	1,3	9,2
Na^+ (°F)	2,6	6,1	26,5
K^+ (°F)	0,6	0,4	1,0
Ca^{2+} (°F)	8,8	4,1	49,0
Mg^{2+} (°F)	1,3	1,5	5,2

ND* : Non déterminé

Les eaux de Loire et de Vienne (conductivité de 272 et 226 de µS/cm, respectivement) sont des eaux plus douces que l'eau de Moselle qui est très chargée en sels minéraux pour une eau de rivière (conductivité de 1710 µS/cm). L'eau de Vienne se caractérise par les concentrations en COD (carbone organique dissous) et COT (carbone organique total) les plus élevées des trois eaux, 6,2 et 6,7 mgC/L respectivement ainsi qu'une valeur de SUVA (Absorbance UV Spécifique) la plus élevée (4,02 L/mgC/m). La détermination du paramètre SUVA est effectuée par absorbance à 254_{nm} de l'eau repportée à sa teneur en COD. Il est ainsi indicatif de l'aromacité de la matière organique dissoute des eaux. Ces deux paramètres, COD et SUVA, indiquent donc que l'eau de Vienne est la plus riche en matière organique et que ces matières organiques présentent un caractère aromatique le plus marqué des trois eaux. La composition de ces matières organiques n'a pas été déterminée plus précisément et n'est donc pas connue. Autre observation concernant l'eau de Vienne, elle est très douce (6°F), la concentration en ion Ca^{2+} n'est que de 16,4 mg/L et celle en Mg^{2+} de 3,6 mg/L.

13.1.2. Demande en monochloramine des eaux de rivières

La charge en matière organique notamment pour les eaux enrichies en MES peut engendrer une surconsommation de monochloramine. C'est pourquoi des suivis des résiduels en biocide dans les trois eaux de rivières et pour les trois conditions (brutes, filtrées et enrichies) ont été effectués. Le Tableau 28 présente le résultat des consommations de monochloramine pour l'ensemble des conditions testées. La surconsommation est exprimée en pourcentage et a été calculée en effectuant la différence entre la consommation de monochloramine dans la condition testée et la consommation en tampon phosphate.

Tableau 28 : Surconsommation de monochloramine exprimée en pourcentage, après 60 minutes, dans les eaux de rivières (filtrées, brutes, enrichies) par rapport à la consommation en tampon phosphate

	Moselle	Loire	Vienne
Filtrée	2%	3%	8%
Brute	6%	6%	11%
Enrichie	3%	15%	13%

Le Tableau 28 indique que la demande en monochloramine est la plus importante dans l'eau de Vienne. Cette eau a présenté une surconsommation en monochloramine de 8% pour la condition filtrée, 11% lorsqu'elle a été utilisé brute et 13% lorsqu'elle a été enrichie en MES, après 60 minutes de temps de contact. Ce résultat est à mettre en relation avec le fait que cette eau est la plus riche en matière organique. L'eau de Loire a également présenté une surconsommation plus importante pour la condition enrichie (15%). Pour l'eau de Moselle, la surconsommation est plus faible par rapport aux deux autres eaux, elle n'a été au maximum de 6% pour la condition d'eau brute après 60 minutes de contact. Cependant, les calculs des valeurs de Ct effectués à partir des résiduels de monochloramine mesurés aux mêmes temps que ceux des prélèvements microbiologiques prennent en compte la demande en monochloramine. Ils ne traduisent donc pas, en cas de consommation de monochloramine comme par exemple pour les eaux enrichies de Loire ou de Vienne, l'effet de cette consommation.

13.2.Comparaison de la sensibilité des légionelles dans les trois eaux de rivières brutes

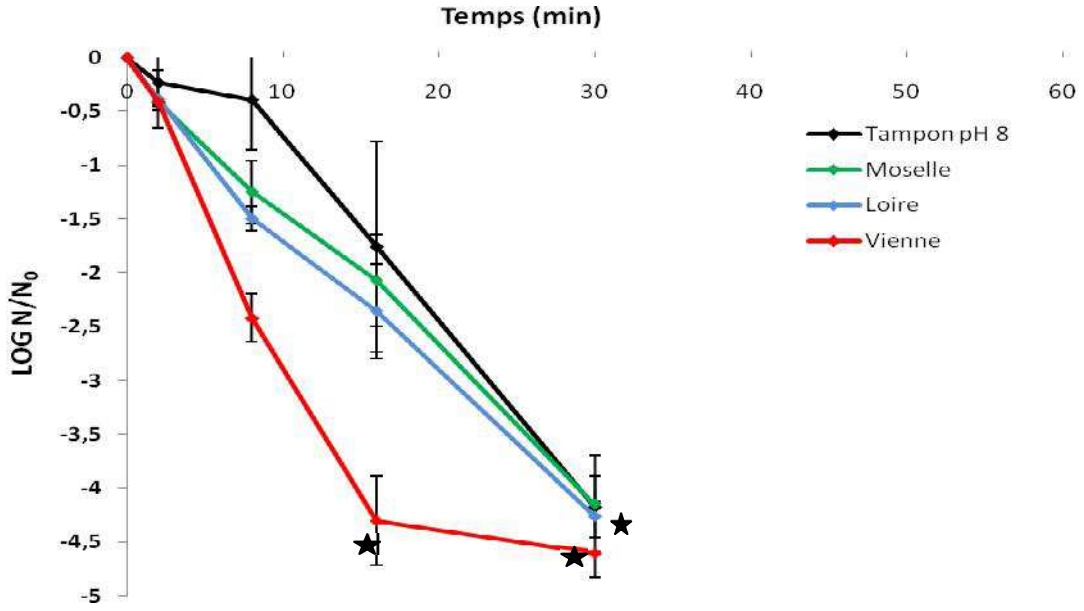
Le suivi de la cultivabilité de *Legionella* lors des traitements à la monochloramine a permis de comparer la réduction de cette cultivabilité lors des différents temps de prélèvement, Figure 55 pour les cellules en phase exponentielle et Figure 56 pour les cellules en phase stationnaire. Lors de certains essais et pour certains points, aucune colonie n'a pu être observée même à la plus faible dilution (concentration en *Legionella* inférieure à la limite de détection de 10^3 UFC/litre). Les points marqués d'une étoile dans la Figure 55 et la Figure 56 correspondent à ces points. Dans ces cas, les valeurs inférieures à la limite de détection ont été considérées égales à cette limite. La valeur de réduction de

cultivabilité est donc supérieure à celle indiquée par le point. De plus, les témoins *Legionella* non traités, Tableau 29, n'ont pas indiqués de perte de cultivabilité dans la durée des traitements.

Tableau 29 : Variation des concentrations en *Legionella*, dans les erlens témoins sans traitement, des eaux de rivières et pour les trois conditions (filtrées, brutes, enrichies)

	Moselle			Loire			Vienne		
	Filtrée	Brute	Enrichie	Filtrée	Brute	Enrichie	Filtrée	Brute	Enrichie
A*	**0,2 ± 0,3**	**0,2 ± 0,1**	**0,0 ± 0,0**	**0,1 ± 0,1**	**0,2 ± 0,1**	**-0,1 ± 0,2**	**-0,2 ± 0,1**	**-0,1 ± 0,1**	**0,0 ± 0,0**
B*	**0,0 ± 0,1**	**-0,1 ± 0,2**	**0,0 ± 0,2**	**0,0 ± 0,0**	**0,0 ± 0,1**	**-0,1 ± 0,1**	**0,0 ± 0,0**	**0,1 ± 0,1**	**0,1 ± 0,1**

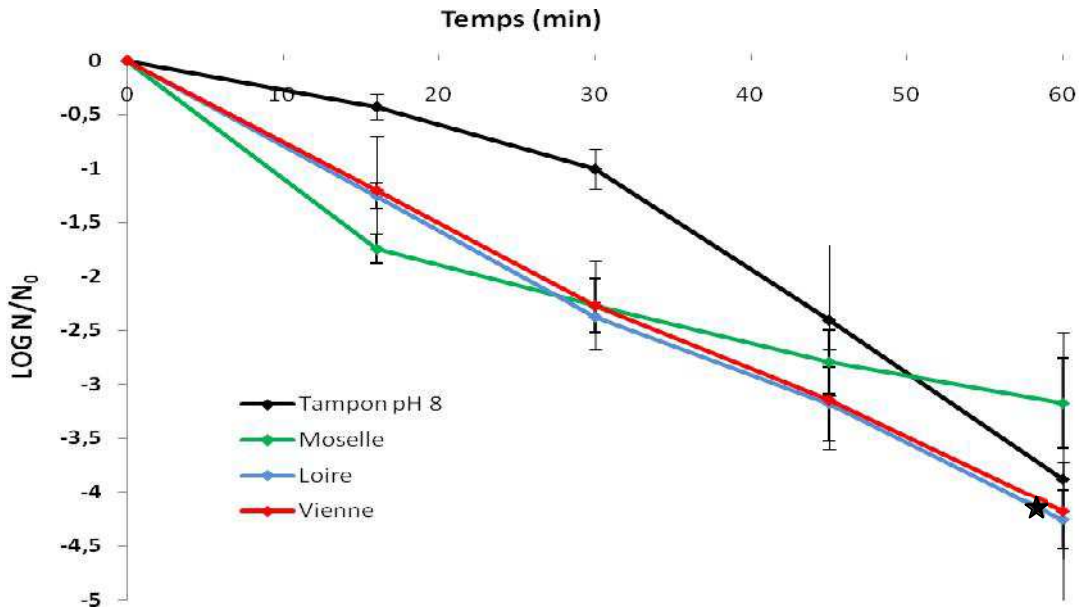
* A (phase exponentielle) B (phase stationnaire)



★ Réduction supérieure à la valeur affichée

Figure 55 : Réduction de cultivabilité de *L. pneumophila* Lens en phase exponentielle dans différentes eaux brutes de rivière et en tampon phosphate pH 8

La Figure 55 présente la réduction de cultivabilité de la souche Lens, en phase exponentielle, dans les différentes eaux (Moselle, Loire et Vienne) ainsi que dans le tampon, après traitement à la monochloramine. Alors que la réduction de la cultivabilité des cellules dans les eaux de Loire et de Moselle est voisine, celle dans l'eau de Vienne est plus rapide. Autre constat, alors qu'en tampon phosphate, une phase de plateau d'une durée de 8 minutes est visible en début de traitement, il n'en n'est rien pour les eaux de rivières. Au final, mise à part dans l'eau de Vienne, une perte de cultivabilité de 3 log est observable entre 16 et 30 minutes de traitement. Pour l'eau de Vienne ce seuil est atteint entre 8 et 16 minutes de traitement.



★ Réduction supérieure à la valeur affichée

Figure 56 : Réduction de cultivabilité de *L. pneumophila* Lens en phase stationnaire dans différentes eaux brutes de rivière et en tampon phosphate pH 8

La Figure 56 présente la réduction de cultivabilité de la souche Lens en phase stationnaire dans les différentes eaux (Moselle, Loire et Vienne) ainsi que dans le tampon, après traitement à la monochloramine. L'évolution de la réduction de cultivabilité est similaire pour les trois eaux. L'eau de Moselle présente toutefois à t 60 minutes une réduction de cultivabilité de 3,2 log contre 4,2 log dans les eaux de Loire et de Vienne. Par contre, la cinétique de réduction dans les eaux de rivière n'est pas le même que celle obtenue dans le tampon à pH 8. En effet, tout comme pour les cellules en phase exponentielle de croissance, il n'a pas été observé de phase de latence en début de traitement dans les eaux de rivière. La réduction de cultivabilité apparaît linéaire. Cette différence de cinétique au début du traitement pourrait être due au fait que l'introduction de *Legionella* dans les eaux de rivière produit un léger stress qui augmente la sensibilité de ces bactéries issues de culture. En effet, les eaux de rivière contiennent d'autres micro-organismes et divers composés alors que le tampon phosphate est stérile et ne contient pas d'élément susceptible d'altérer *Legionella*.

Le Tableau 30 présente les valeurs de $Ct_{99,9\%}$ pour les *Legionella* en phase exponentielle et stationnaire et ce pour les trois eaux (Moselle, Loire et Vienne) et les trois conditions testées (brute, filtrée, enrichie). Ces valeurs ont été déterminées, à nouveau par extrapolation grâce aux équations de réduction de viabilité comme lors des calculs effectués lors des traitements en tampon phosphate. De plus, pour la détermination des équations de droite, les points pour lesquels les 3 log d'abattement avaient déjà été atteints pour le temps précédent ont été exclus car, les valeurs de dénombrement ont souvent été inférieures à la limite de détection. Par exemple, c'est le cas pour l'eau de Vienne, pour les

traitements en eaux brutes des cellules en phase exponentielle, Figure 55 : le point t30 minutes n'a pas été pris en compte car dès t16 minutes, certaines valeurs étaient inférieures à la limite de détection.

La comparaison des $Ct_{99,9\%}$ en eau brute, Tableau 30 indique une sensibilité identique dans le tampon phosphate pH 8 et dans l'eau de Moselle et ce pour les deux stades physiologiques : 17 ± 0,2 mg.min/L pour la phase exponentielle et 46,1 ± 4,1 mg.min/L pour la phase stationnaire dans l'eau de Moselle versus 15,9 ± 1,3 mg.min/L et 38,4 ± 18,9 mg.min/L dans le tampon phosphate. Il en est de même pour l'eau de Loire, la sensibilité pour la phase exponentielle ($Ct_{99,9\%}$ = 17,3± 0,5 mg.min/L) et pour la phase stationnaire ($Ct_{99,9\%}$ = 40,0 ± 3,2 mg.min/L) sont similaires à celles obenues en tampon phosphate pH 8. Par contre, la sensibilité est accrue dans l'eau de Vienne, dans laquelle les deux phases physiologiques présentent des $Ct_{99,9\%}$ plus faibles que dans le tampon : $Ct_{99,9\%}$ de 7,9 ± 1,3 pour la phase exponentielle soit un facteur d'environ 2 et 30,7 ± 5,7 mg.min/L pour la phase stationnaire soit un facteur d'environ 1,2.

L'analyse physico-chimique des eaux, Tableau 27 a révélé que l'eau de Vienne est la plus riche en matière organique. Il se pourrait alors que les matières organiques aient un effet négatif, dans le cas de l'eau de Vienne, sur *Legionella*. Un ou des composés dissous comme par exemple des sous produits de chloramination ou un autre paramètre physico-chimique non déterminé pourraient également présenter des effets dommageables sur *Legionella* et ainsi augmenter la sensibilité de la bactérie au traitement à la monochloramine. Le rôle du COD sur l'efficacité de désinfection du dioxyde de chlore, un autre biocide oxydant, a été étudié par différents auteurs dont les conclusions ne sont pas en accord. Pour Ayyiliz *et al.*, qui ont réalisé des essais de désinfection au dioxyde de chlore sur des bactéries *E.coli*, la matière organique a un effet négatif sur l'efficacité de désinfection du dioxyde de chlore (Ayyildiz *et al.*, 2009). Par contre pour Barbeau *et al.*, qui ont effectué des essais de désinfection au dioxyde de chlore sur des spores de *Bacillus subtilis* et des phages MS2, l'ajout de matière organique a augmenté l'efficacité de désinfection du dioxyde de chlore (Barbeau *et al.*, 2004). Pour ces auteurs la formation d'agrégats générée par des interactions entre les micro-organismes, la matrice et le dioxyde de chlore est diminuée par l'ajout de matière organique augmentant ainsi l'efficacité de désinfection. Cependant, ils ajoutent que l'impact de la qualité d'eau sur l'efficacité de désinfection n'est pas seulement lié au biocide utilisé mais également au type de micro-organisme ciblé et aux interactions du biocide et du micro-organisme avec la matrice de l'eau. Il se pourrait alors que les interactions entre *Legionella* et l'eau de Vienne soient différentes de celles dans les deux autres eaux de rivières du fait de sa qualité d'eau différente (eau très douce et plus riche en matière organique). En effet, l'eau de Vienne est très douce (6°F). Cependant, il est difficile de commenter l'effet de ces concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} à elles-seules, puisque l'effet de la dureté de l'eau est controversé. Des associations positives (Lasheras *et al.*, 2006), négatives (Kustnetsov *et al.*, 1993) et même des tendances en U,

c'est-à-dire un minimum de colonisation pour des valeurs de dureté moyenne (25-35 °F) (Bargellini *et al.*, 2011) ont été décrites.

De plus, la présence de bactériocines ou d'autres bactéries ayant une interaction négative avec *Legionella* comme par exemple des bactéries du genre *Pseudomonas* (Gomez-lus *et al.*, 1993) pourrait être un autre facteur expliquant la plus grande sensibilité de *Legionella* dans l'eau de Vienne. Le zooplancton qui se nourrit de phytoplancton ainsi que les bactéries hétérotrophes peuvent également être des compétiteurs des légionelles et produire des bactériocines.

13.3.Effet des MES (eaux filtrées, brutes et enrichies)

Dans le but d'observer d'éventuels effets des MES, les MES des trois eaux de rivières ont été soit ôtées par filtration sur membrane de porosité 0,45 µm soit concentrées. Il convient de noter que d'après le Tableau 27, nos MES sont de nature organique à plus de 70% (%MVS supérieur à 70%). Les *Legionella* ont ensuite été ajoutées à ces échantillons (eaux filtrées ou enrichies en MES) puis mises en contact pendant une heure pour initier une interaction entre ces bactéries et la matrice. Les traitements ont ensuite été effectués. Le Tableau 30 présente les valeurs de $Ct_{99,9\%}$ pour les *Legionella* en phase exponentielle et stationnaire, pour les trois eaux (Moselle, Loire et Vienne) et les trois conditions testées (brute, filtrée, enrichie).

Tableau 30 : Comparaison des $Ct_{99,9\%}$ (mg.min/L) dans les différentes eaux de rivières brutes, filtrées ou enrichies en MES et en tampon phosphate

			Moselle	Loire	Vienne	Tampon phosphate
Phase exponentielle	Eau brute	Equation de droite R^2	y= - 0,1769x-0,0516 R_2 = 0,99	y= -0,1782x-0,1282 R_2 = 0,99	y= -0,3874x+0,0175 R_2 = 0,99	y= -0,1861x+0,2668 R_2 = 0,96 **15,9 ± 1,3**
		$Ct_{99,9\%}$ (mg.min/L)	**17,0 ± 0,2**	**16,5 ± 3,7**	**7,9 ± 1,3**	
	Eau filtrée	Equation de droite R^2	y= -0,1751x-0,1279 R_2 = 0,98	y=- 0,223x-0,2249 R_2 = 0,99	y= -0,4381x+0,0384 R_2 = 0,99	
		$Ct_{99,9\%}$ (mg.min/L)	**17,3 ± 1,4**	**13,7 ± 0,8**	**6,8 ± 0,8**	
	Eau enrichie	Equation de droite R^2	y= -0,1622x-0,1612 R_2 = 0,98	y= -0,1755x-0,3046 R_2 = 0,91	y= -0,4437x+0,1008 R_2 = 0,99	
		$Ct_{99,9\%}$ (mg.min/L)	**22,0 ± 6,4**	**17,3 ± 0,5**	**6,8 ± 1,6**	
Phase stationnaire	Eau brute	Equation de droite R^2	y= -0,066x-0,4611 R_2 = 0,91	y= -0,0902x+0,0706 R_2 = 0,97	y= -0,0986x-0,0266 R_2 = 0,99	y= -0,0871x+0,4601 R_2 = 0,91 **38,4 ± 18,9**
		$Ct_{99,9\%}$ (mg.min/L)	**46,1 ± 4,1**	**33,5 ± 3,5**	**30,7 ± 5,7**	
	Eau filtrée	Equation de droite R^2	y= -0,0658x-0,3143 R_2 = 0,94	y= -0,11x-0,1879 R_2 = 0,96	y= -0,1177x+0,0526 R_2 = 0,99	
		$Ct_{99,9\%}$ (mg.min/L)	**45,9 ± 1,7**	**33,7 ± 9,7**	**29,4 ± 14,6**	
	Eau enrichie	Equation de droite R^2	y= -0,0809x-0,2765 R_2 = 0,97	y= -0,0779x-0,2663 R_2 = 0,91	y= -0,1059x-0,3261 R_2 = 0,94	
		$Ct_{99,9\%}$ (mg.min/L)	**39,6 ± 17,8**	**40,0 ± 3,2**	**32,5 ± 15,8**	

D'après le Tableau 30, les MES ne semblent pas avoir d'effet sur la sensibilité de *Legionella* au traitement à la monochloramine. En effet, les valeurs de $Ct_{99,9\%}$ ne varient pas entre l'eau brute, l'eau filtrée et l'eau enrichie (dans nos conditions d'enrichissement en MES) même si les écart-types des $Ct_{99,9\%}$en eaux enrichies sont plus élevés que pour les autres conditions. Ce constat est valable pour les trois eaux testées et les deux phases physiologiques. Cette absence de différence de sensibilité entre les eaux brutes et les eaux filtrées pourrait suggèrer qu'il n'y a pas eu d'interaction entre *Legionella* et les MES ou bien qu'elles n'ont pas été assez importantes pour protéger la bactérie du traitement. Le temps de contact avant le traitement, entre les *Legionella* et les eaux, a été d'une heure dans notre étude. D'autres auteurs (Barbeau *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 1996), ont mis en contact, respectivement des spores de *Baccilus subtilis*, des *Sphingomonas* et des *Klebsiella pneumoniae* pendant 24 heures afin de promouvoir des interactions entre les micro-organismes et les MES de leur matrice. Néanmoins malgré 24 heures de temps de contact, Barbeau *et al.*, ont constaté que pour le chlore, les valeurs de $Ct_{99\%}$ effectif d'inactivation des spores de *B. subtilis* en eau naturelle n'ont varié

que de 2 à 16% par rapport aux valeurs obtenues en eau tamponnée ultra-pure. De plus, bien que les auteurs soulignent que la composition des MES de leurs eaux n'est probablement pas 100% inorganique, la filtration des eaux naturelles sur membrane de porosité de 0,45µm n'a pas augmenté l'efficacité de désinfection du chlore ni celle du dioxyde de chlore (sauf pour une eau) (Barbeau *et al.*, 2005). Les auteurs n'émettent pas d'hypothèse pour expliquer ce résultat. Pour eux, ce sont les agglutinations formées par les micro-organismes qui sont le plus grand challenge pour la désinfection de l'eau. Ils ajoutent que le rôle de la demande en oxydant n'est pas la variable la plus importante pour l'efficacité de désinfection. L'étude de Gauthier et *al.* a montré des résultats identiques : malgré 24 heures de mise en contact entre des bactéries du genre *Sphingomonas* et des particules de goethite (α-Fe00H) de tailles de 10 à 50 µm, aucune protection vis-à-vis d'un traitement au chlore n'a été observée pour les bactéries adhérées (Gauthier *et al.*, 1999). Morin *et al.*, soulignent tout de même qu'il serait intéressant de connaître l'effet d'un temps de contact plus court ou plus long que 24 heures (Barbeau *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 1996). Dans notre cas, la même observation peut être effectuée pour la monochloramine : la sensibilité de *L. pneumophila* n'est pas augmentée dans des eaux filtrées par rapport à des eaux brutes.

Dans notre étude, le temps de contact d'une heure a été choisi pour limiter les possibilités de modification de l'état physiologiques des cellules. Pour les cellules en phase stationnaire, le stress engendré par 24 heures dans un milieu carencé aurait probablement entraîné l'arrêt de la phase de multiplication et donc un changement de phase physiologique. La comparaison de la sensibilité de *Legionella* en phase exponentielle dans les différentes eaux de rivière n'aurait alors pas été possible. Par ailleurs, Mallegol et *al.*, ont utilisé un protocole dans lequel un temps d'incubation de 1,5 heure a été utilisé pour quantifier l'adhésion de différentes souches de *L. pneumophila* dans des puits de microplaques (Mallegol *et al.*, 2012). Une monocouche de cellules dispersées attachées à la surface s'est alors formée. Les étapes initiales d'adhésion de *Legionella* interviennent dans un laps de temps rapide, ce qui suggère que dans nos conditions, une partie des *Legionella* a peu-être pu adhérer et interagir avec les MES des eaux de rivière.

D'autres études vont à l'encontre d'une absence de protection des MES. Pour Dickenson et Sansalone, les matières particulaires de type sédiments (supérieures à 75 µm) pourraient offrir une protection aux micro-organismes et avoir ainsi un effet négatif sur la désinfection. Par contre, les matières particulaires plus petites n'offriraient pas de protection car la taille des pores serait trop petite, les micro-organismes resteraient alors à la surface (Dickenson and Sansalone, 2011). Selon, Narkis *et al.*, l'efficacité de désinfection au dioxyde de chlore dépend, comme pour les autres biocides, d'une part de la sensibilité du micro-organisme au biocide et d'autre part de la pénétration de ce biocide dans la particule solide (Narkis *et al.*, 1995). Pour Kahler *et al.*, la composition , la taille et la structure de ces particules seraient plus importantes que leur quantité (Kahler *et al.*, 2010). Le rôle de la matrice eau de

rivière et des MES sur l'efficacité de désinfection de *Legionella* ne sont pas décrites dans la littérature. L'absence de données pour *Legionella* et l'effet controversé des MES rend difficile la discussion de nos résultats à savoir l'absence d'effet suite à l'ajout de MES lors de nos essais.

En conclusion, lors de ces essais de traitements en eaux de rivières, des différences de sensibilité à la monochloramine ont été observées entre les trois eaux testées mettant ainsi en évidence l'influence de la qualité d'eau sur la désinfection. C'est dans l'eau de Vienne, que les $Ct_{99,9\%}$ se sont avérés les plus faibles notamment pour les cellules en phase exponentielle. Par contre, il n'a pas été noté d'effet suite à l'ajout des MES malgré un enrichissement d'un facteur 10 environ avec les MES de la rivière (jusqu'à des concentrations comprises entre 90 et 220 mg/L de MES selon la rivière). L'effet des MES est sujet à discussion dans la littérature, il est donc délicat de conclure sur cette absence d'impact notamment du fait que lors de notre étude la durée de mise en contact préalable de *Legionella* avec l'eau avant le traitement, n'a été que d'1 heure contre 24 heures dans d'autres études.

DISCUSSION GENERALE

Notre étude s'est intéressée à la problématique *Legionella* et notamment à la relation amibes-légionelles. *Legionella* est une bactérie ubiquitaire des environnements aquatiques dont il est difficile de prévenir la colonisation dans les systèmes anthropisés (Steinert *et al.*, 2002). *Legionella* se multiplie dans ces environnements anthropisés notamment grâce à l'échauffement des eaux dans les process industriels. La relation amibes-légionelles est au cœur de la problématique de *Legionella*. En effet, dans la littérature, il est suggéré que, dans l'environnement, *Legionella* se multiplie dans les amibes qui constituent leur principal hôte. Néanmoins, sortie de ces hôtes *Legionella* serait capable de persister de longues périodes dans les biofilms (Taylor *et al.*, 2013; Wingender and Flemming, 2011).

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la capacité de 12 souches d'amibes issues de 4 circuits de refroidissements de centrales électriques appartenant aux genres amibiens *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella* à permettre la prolifération de 2 souches de *L. pneumophila*. Dans la littérature, c'est dans les 3 genres amibiens précédemment cités que la prolifération de *Legionella* est la plus décrite (Lau and Ashbolt, 2009). Il n'est donc pas surprenant que ces genres amibiens se soient révélés permissifs à *Legionella* lors de notre étude. Le fait que toutes les souches amibiennes se soient montrées permissives aux 2 souches de *Legionella* testées, suggère que les *Legionella* ont probablement la capacité à se multiplier facilement dans les circuits sachant que ces genres amibiens sont fréquemment rencontrés. Dans la littérature, il n'est pas décrit de comparaison de la permissivité à *Legionella* dans plusieurs souches d'amibes du même genre. Cependant, le fait d'avoir testé 2 souches appartenant au sérogroupe 1, qui a la plus forte prévalence (84,2%) lors des cas de légionellose (Yu *et al.*, 2002) pourrait expliquer pourquoi ces 2 souches de légionelle ont pu infecter l'ensemble des amibes testées. D'après Messi *et al.*, la virulence des souches de *Legionella* pourrait être liée à leur capacité à proliférer au sein des amibes et aussi à leur cytophatogénicité c'est-à-dire à leur capacité à lyser la cellule hôte (Messi *et al.*, 2013). D'après d'autres auteurs, Tyndall et Domingue, les souches peu virulentes de *Legionella* seraient moins aptes à se multiplier dans les amibes (Tyndall and Domingue, 1982). De plus, d'après certains auteurs les amibes du genre *Acanthamoeba* pourraient permettre une prolifération plus importante de *Legionella* par rapport aux autres genres amibiens notamment aux genres *Naegleria* (Chang *et al.*, 2009; Declerck *et al.*, 2005; Dey *et al.*, 2009). Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différences significatives de prolifération entre les différents genres amibiens. En effet, après 72 heures de co-culture à la température de 40°C et pour une MOI de 0,1, une multiplication d'environ 2 unités logarithmiques a été observée dans les 3 genres. Malgré l'absence de différences signifcatives, nous avons, tout de même, pu observer une tendance à une prolifération de *Legionella* plus importante dans les amibes du genre *Acanthamoeba*.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux paramètres températures et MOI (ratio légionelles/amibes) qui peuvent influencer la prolifération de *Legionella*. Au regard de nos résultats, la température de 40°C semble favoriser la prolifération par rapport aux températures de 25 et 30°C. Dans la littérature,

la température est donnée comme un facteur d'influence pour la prolifération de *Legionella* dans les amibes. Pour des températures basses (inférieures à une vingtaine de degrés), la multiplication de *Legionella* est faible voire nulle (Buse and Ashbolt, 2011; Ohno *et al.*, 2008; Rowbotham, 1980). Ohno *et al.*, suggèrent qu'en dessous de 25°C, le gène global de régulation *csrA* n'est pas activé. Ce gène est un répresseur des caractères de phase transmissive et un activateur de réplication (Molofsky and Swanson, 2003). Cette température serait alors une température seuil pour la prolifération ou non de *Legionella*. De plus la température 40°C est plus proche de l'optimum de croissance de *Legionella* qui se situe pour une température d'environ 36°C. Ceci pourrait alors expliquer l'effet progressif observé lors de certains essais entre les températures 30°C et 40°C. Concernant l'effet de la MOI, il est plus difficile de conclure. Lors de nos tests la MOI la plus élevée (10) a inhibé ou limité la multiplication. Pourtant, d'autres auteurs (Dey *et al.*, 2009; Ohno *et al.*, 2008) ont observé des proliférations avec des MOI de 50 pour Dey *et al.*, et jusqu'à 1000 pour Ohno *et al.*, lors de leur test de co-culture mais avec un protocole d'infection différent du notre. Leur protocole consiste à réaliser des co-cultures à de fortes MOI pour induire la pénétration de *Legionella* dans les amibes puis après quelques heures de temps de contact, les *Legionella* extracellulaires sont éliminées. A contrario, notre protocole a consisté à simplement mettre en contact *Legionella* et amibes à des MOI plus faibles (0,1 et 10) sans éliminer les *Legionella* extracellulaires. De ce fait, lors de nos essais, un effet de cytopathogénicité ou bien un effet physiologique sur les amibes, comme par exemple l'induction d'enkystement est peut être responsable de la différence des observations faites à MOI 10 par rapport à la MOI 0,1. En effet, d'après Gao *et al.*, l'effet cytopathogénique sur les macrophages est accéléré pour des MOI plus élevées (50 versus 5 ou 0,5) (Gao and Abu Kwaik, 1999). Il convient de noter que dans les circuits, d'autres micro-organismes sont présents et que les amibes ne sont pas en contact qu'avec des bactéries du genre *Legionella*. De ce fait, le paramètre MOI est plus difficile à évaluer et les différents protocoles mis en place ne tiennent pas compte des interactions complexes qui existent entre les différents micro-organismes dans les circuits.

Les essais menés lors de notre étude concernant la relation amibe-légionelles indiquent que les 2 souches de *Legionella* ont été capables de proliférer dans l'ensemble des amibes à des taux globalement proches. Les amibes du genre *Acanthamoeba* pourraient toutefois permettre une prolifération un peu plus importante après 72 heures. L'influence de la température a été notable entre 25°C et 40°C : la température de 40°C a favorisé la prolifération de *Legionella*. Pour le paramètre MOI, les résultats obtenus ont montré une prolifération à MOI 10 limitée. Concernant la problématique de prolifération de *Legionella* dans les circuits, ces résultats montrent que la prolifération intra-amibienne est maximale pour des températures proches de la température optimum de croissance de la bactérie, en milieu de culture qui est de 35°C d'après Feeley *et al.*, (Feeley *et al.*, 1979). De plus, les genres amibiens testés (*Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella)*, fréquemment rencontrés dans les circuits, permettent facilement la multiplication de *Legionella*. Ceci implique que

Legionella a probablement la capacité à se multiplier facilement dans de nombreux hôtes, dans les circuits de refroidissement des centrales électriques.

Une fois que les légionelles ont proliféré dans les amibes, elles peuvent être relarguées dans le milieu extérieur. Dans l'environnement *Legionella* peut donc être sous forme libre ou bien associée à leurs principaux hôtes, les amibes. Dans ce dernier cas, elles peuvent être retrouvées dans la forme trophozoite de l'amibe puisque cette forme permet sa multiplication. Certains auteurs (Declerck *et al.*, 2005; Kilvington and Price, 1990; Skinner *et al.*, 1983) décrivent également leur présence dans les kystes amibiens du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria.* Ce type d'association est néanmoins sujet à discussion dans la littérature. Ainsi comme pour d'autres études, (Bouyer *et al.*, 2007; Greub and Raoult, 2003), nous n'avons pas réussi, lors de nos essais, ni à produire ni à identifier *Legionella* dans des kystes amibiens. L'état d'association ou non de *Legionella* aux amibes peut influer sur l'efficacité du traitement chimique. En particulier, les kystes amibiens, notamment ceux du genre *Acanthamoeba* qui sont très difficiles à détruire, peuvent conférer une protection physique aux légionelles. Loret et Greub, citent des valeurs de $Ct_{99\%}$ supérieures à 1000 mg.min/L, pour ces kystes, lors de traitement au chlore (Loret and Greub, 2010). Dans une étude que nous avons précédemment menée, nous avons estimé le $Ct_{99\%}$ d'une souche d'*Acanthamoeba*, pour différents biocides : 865 mg.min/L pour le chlore, 352 mg.min/L pour la monochloramine et 35 mg.min/L pour le dioxyde de chlore montrant ainsi la difficulté à éliminer ces kystes quelque soit le biocide utilisé (Dupuy *et al.*, 2013). Par ailleurs, plusieurs auteurs suggèrent également que les *Legionella* intra-kystes pourraient être à l'origine des difficultés d'éradication de la bactérie dans les réseaux et circuits (Kilvington and Price, 1990; Skinner *et al.*, 1983; Thomas *et al.*, 2004).

Or, à l'heure actuelle aucune méthode ne permet de déterminer l'état d'association de *Legionella* (libre, associée aux trophozoites et/ou associée aux kystes) dans l'environnement. On notera toutefois, que Kao *et al*., ont récemment décrit un protocole visant à déterminer la proportion de *Legionella* libres et de *Legionella* intra-amibiennes sans distinguer, les fractions associées aux trophozoites et aux kystes (Kao *et al.*, 2012). La mise au point d'une telle méthode permettant de faire le distinguo entre *Legionella* intra-trophozoites et *Legionella* intra-kystes a donc constitué un des objectifs de la thèse.
Pour ce faire, nous avons cherché à développer un protocole original visant à séparer les légionelles en fonction de ces états d'association. C'est pourquoi, dans notre protocole l'échantillon de départ est divisé en deux parties :

- une partie pour séparer et quantifier les légionelles libres et les légionelles intra-amibiennes
- une autre partie pour séparer et quantifier les légionelles intra-kystes

La concentration en *Legionella* intra-trophozoites est quant à elle déterminée par le calcul via la différence entre les concentrations en *L. pneumophila* totales de l'échantillon de départ et la somme

des *L. pneumophila* libres et intra-kystes. Avant de mettre en œuvre ce protocole, diverses méthodes de séparation ont été testées (gradient de Percoll, immuno-capture, filtration). C'est la méthode de filtration sur des filtres en acétate de cellulose de 5 µm de porosité qui a été retenue, les autres méthodes ne sont apparues compatibles avec nos objectifs. Cette méthode présente l'avantage de retenir les kystes amibiens des genres *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella* tout en laissant passer les *Legionella* libres.

Pour la séparation des légionelles libres et des légionelles intra-amibiennes nous avons testé différentes méthodes (fixation des cellules à l'aide de formol et de ses dérivés, à l'aide d'une solution à base de zinc, à l'aide d'une solution de Carnoy ou bien encore fixation par la méthode HOPE et filtration en présence de Percoll) pour rendre plus résistants les trophozoites à la filtration et ainsi éviter le relarguage des légionelles intra-trophozoites lors de la filtration. En effet, les trophozoites notamment ceux du genre *Naegleria* sont lysés lors de la filtration. D'après Pernin *et al.*, seuls 10% d'entre eux sont récupérés après filtration sur membrane de porosité 1,2 µm et avec une pression de filtration de 3 à 5 kPa (Pernin *et al.*, 1998). Au final nous avons choisi d'effectuer les filtrations en présence de Percoll. Les résultats obtenus montrent que la méthode permet de limiter la lyse des trophozoites d'*Acanthamoeba.* Des essais supplémentaires sont toutefois nécessaires pour fiabiliser la méthode. Des essais avec les amibes du genre *Naegleria* sont également à effectuer pour valider la méthode et d'autres sont à initier avec d'autres genres amibiens comme par exemple *Hartmannella*. Par contre la méthode ne permet pas, en l'état, de bien séparer les *Legionella* libres de celles présentes dans les amibes sous forme trophozoite. De nouveaux essais sont à envisager pour comprendre et résoudre ce problème notamment en s'assurant que le Percoll n'entraîne pas d'interaction physique entre les micro-organismes lorsqu'ils sont mis dans un même échantillon.

Pour la séparation des légionelles intra-kystes, nous avons cherché à mettre au point un protocole pour en produire en grande quantité afin d'évaluer l'efficacité du protocole de séparation des légionelles intra-kystes et pour visualiser ces légionelles par méthode FISH. Après avoir testé différents protocoles afin d'obtenir ce type d'association, notamment celui de Declerck *et al.* (Declerck *et al.*, 2005), il ne nous a pas été possible d'observer de légionelles intra-kystes. Cet échec provient peut-être du fait que le protocole que nous avons testé n'était pas strictement identique à celui décrit par Declerck *et al.*. Néanmoins, l'absence de *Legionella* dans les kystes tend à montrer qu'il est difficile d'obtenir ce type d'association et qu'il pourrait ne représenter qu'une faible proportion parmi les types d'associations légionelles-amibes. En effet, pour Ohno *et al.*, les amibes expulseraient les *Legionella*, dans des vésicules, lors de l'enkystement plutôt que de les conserver dans les kystes (Ohno *et al.*, 2008). De ce fait afin d'évaluer l'efficacité du protocole visant à séparer et quantifier les légionelles intra-kystes, nous avons quantifié les kystes amibiens pour déterminer si le protocole permettait bien de les récupérer à la fin du traitement. Nous avons également quantifié des *Legionella* libres et intra-

trophozoites pour vérifier l'efficacité du protocole à les éliminer. Les résultats ont montré l'efficacité du protocole à éliminer les légionelles libres et intra-trophozoites (-2,5 log par quantification par PCRq), par contre les kystes de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba*, dans une moindre mesure, ont été perdus lors de l'application du traitement. Seuls 0,05% et 10%, respectivement, ont été collectés à la fin du protocole. Ces kystes ont peut-être été altérés en raison de la succession des différents traitements ou bien, ils ont été perdus lors des différentes étapes de lavage et de centrifugation. Des dénombrements des kystes après chaque étape sont à envisager pour identifier les étapes critiques du protocole et proposer des solutions adaptées pour améliorer la récupération de ces kystes et ainsi pouvoir mettre en œuvre ce protocole. L'utilisation des cycles de congélation-décongélation pour libérer les légionelles intra-amibiennes comme l'ont fait Kao *et al.*, pourrait également permettre de limiter le nombre d'étapes dans notre protocole de séparation des légionelles intra-kystes, et ainsi faciliter la récupération des kystes amibiens en limitant leur perte ou leur altération suite à l'enchaînement des traitements.

Au final, il s'est avéré difficile de mettre en œuvre un protocole permettant de déterminer l'état d'association de *Legionella* notamment en raison de verrous méthodologiques. Par ailleurs, la mise au point de ce type de méthodes est longue et dépendante des genres amibiens. C'est sans doute pourquoi à l'heure actuelle il n'existe pas dans la littérature, de description de protocole permettant de séparer *Legionella* selon son état d'association. Le développement de notre protocole doit être poursuivi afin de mettre au point une méthode permettant de déterminer l'état d'association des légionelles dans l'environnement.

Legionella étant une bactérie pathogène, et le risque de légionellose étant identifié comme étroitement lié aux systèmes susceptibles de générer des aérosols contaminés (Campese *et al.*, 2010), des réglementations ont été mises en place pour limiter les proliférations dans les tours aéro-réfrigérantes. Afin de respecter ces réglementations, des traitements chimiques ou physiques sont employés. Dans les circuits semi-fermés équipés de TAR des centrales électriques, des traitements à la monochloramine sont appliqués (résiduel maintenu à 0,25 mg/L équivalent Cl_2 en continu ou en séquentiel). La littérature indique que l'état physiologique dans lequel se trouve la bactérie influe sur sa sensibilité. Selon Ayyildiz et *al.*, les bactéries en phase stationnaire prolongée sont plus difficiles à éliminer que celles en phase exponentielle de croissance (Ayyildiz *et al.*, 2009). Par ailleurs, selon Barker et *al.*, le passage de *Legionella* dans les amibes diminue leur sensibilité à des biocides organiques (Barker *et al.*, 1992).

De plus, actuellement, les seules valeurs de Ct issues d'inactivation à la monochloramine de *Legionella* décrites dans la littérature ont été obtenues à partir de cellules cultivées sur milieu gélosé (Cunliffe, 1990; Dupuy *et al.*, 2011; Jakubek *et al.*, 2013a). Rappelons également que lors des travaux

antérieurs à la thèse, (Dupuy *et al.*, 2011), visant à comparer l'efficacité de 3 traitements biocides oxydants (le chlore, la monochloramine et le dioxyde de chlore) sur des *Legionella* libres et des *Legionella* intra-trophozoites, la monochloramine a présenté une efficacité similaire ($Ct_{99,9\%}$ ~ 25 mg.min/L) à pH 8 et à 30°C. Celà n'a pas été le cas pour le dioxyde de chlore et pour le chlore qui se sont avérés moins efficaces vis-à-vis des *Legionella* intra-trophozoites par rapport à des *Legionella* libres Nous avons alors émis l'hypothèse d'un mode d'action différent pour la monochloramine. Il apparaît donc intéressant d'aller plus loin dans la détermination de la sensibilité de ces *Legionella* à la monochloramine dans des états physiologiques différents.

Nos résultats indiquent qu'après multiplication dans les amibes, la sensibilité des *Legionella* est diminuée. Bien que les valeurs de $Ct_{99,9\%}$ en tampon phosphate à pH 8 et 30°C, soient proches entre les cellules post amibes (46,5 ± 6,2 mg.min/L) et les cellules en phase stationnaire (38,4 ± 18,9 mg.min/L) qui se sont multipliées dans un milieu de culture (BYE), la réduction de cultivabilité est plus rapide pour les cellules stationnaires. Dans la littérature, des auteurs ont observé une augmentation de la résistance de *Legionella*, après passage dans les amibes, à des antibiotiques ou bien encore à des biocides organiques (Barker *et al.*, 1992; Barker *et al.*, 1995). D'autres auteurs, Kwaik *et al.*, ont constaté une tolérance au chlore ainsi qu'à d'autres stress (choc osmotique, choc thermique, stress oxydatif…) meilleure pour des *L. pneumophila* après infection d'un hôte amibien (Abu Kwaik *et al.*, 1997). Pour expliquer cette moindre sensibilité, certains auteurs (Chang *et al.*, 2007; Kuchta *et al.*, 1985) suggèrent que la multiplication dans les amibes induirait chez *Legionella* des adaptations phénotypiques puisque la multiplication dans les amibes se fait dans des conditions de croissance défavorables. Autre constat, nos essais montrent que les cellules en phase exponentielle sont en moyenne 2 fois plus sensibles que des cellules en phase stationnaire. Les valeurs de $Ct_{99,9\%}$ sont estimées respectivement à 15,9 ± 1,3 mg.min/L et 38,4 ± 18,9 mg.min/L pour la souche *L. pneumophila* Lens. L'autre souche (QEE 6945) a présenté des valeurs de sensibilité du même ordre. Il n'est pas étonnant que les cellules en phase exponentielle soient plus sensibles. En effet, dans la littérature les *Legionella* en phase exponentielle sont décrites comme moins résistantes aux stress que celles en phase stationnaire (Steinert *et al.*, 2002). Les *L. pneumophila* en phase stationnaire en plus d'être plus résistantes et de posséder une paroi plus épaisse ont une expression génétique et protéique modifiée (Swanson and Hammer, 2000). Ces résultats impliquent que lors des traitements à la monochloramine, il sera plus aisé de limiter la prolifération des *Legionella* (les cellules en phase de multiplication sont les plus sensibles), plutôt que d'éliminer les *Legionella* déjà présentes qui se sont probablement multipliées dans les amibes du circuit (les cellules post-amibes sont les moins sensibles). Nos résultats soulignent une nouvelle fois, l'importance des amibes dans l'écologie de *Legionella* car en plus de permettre une multiplication importante et rapide, le passage dans les amibes confère aux *Legionella* une sensibilité moindre au traitement à la monochloramine.

Nous nous sommes également intéressé à l'effet de la matrice eau brute de rivière et à celui des MES sur la sensibilité de *Legionella* au traitement à la monochloramine. Pour ce faire nous avons comparé la sensibilité de *Legionella*, en phase exponentielle et en phase stationnaire, dans trois eaux de rivières (Vienne, Loire et Moselle) brutes, filtrées ou enrichies en MES. La comparaison des trois eaux montre une sensibilité accrue des *Legionella*, notamment en phase exponentielle, dans l'eau de Vienne. En effet dans cette eau le $Ct_{99,9\%}$ est de 7,9 ± 1,3 mg.min/L pour la phase stationnaire et de 30,7 ± 5,7 mg.min/L pour la phase exponentielle soit des facteurs d'environ 2 et 1,2 , respectivement, par rapport à la sensibilité dans les eaux des deux autres de rivière qui ont été proches de celle déterminée en tampon phosphate. Après analyse des caractères physico-chimiques des eaux de rivière, l'eau de Vienne se révèle être la plus riche en matière organique. De plus, ces matières organiques présentent le caractère aromatique le plus important par rapport aux deux autres eaux. Cette eau est également très douce (dureté carbonatée = 6°F) comparée aux deux autres. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises quant à la plus grande sensibilité de *Legionella* dans cette eau : soit un ou des composés non déterminés en seraient la cause, comme par exemple des sous produits de chloramination ou la présence d'un ou plusieurs composés organiques dissous de types bactériocines ou toxines sécrétées par le zooplancton, ou bien encore la présence de bactérie ayant une interaction négative sur *Legionella*, comme par exemple celle du genre *Pseudomonas* en seraient la cause. En effet, d'après (Gomez-lus *et al.*, 1993), la présence de certaines bactéries comme celles du genre *Pseudomonas* peut avoir un impact négatif sur *Legionella*. Par ailleurs, Barbeau et *al.*, soulignent que l'impact de la qualité d'eau sur l'efficacité de désinfection n'est pas seulement lié au biocide utilisé mais également au type de micro-organisme ciblé et aux interactions du biocide et du micro-organisme avec la matrice eau (Barbeau *et al.*, 2004). D'après les informations fournies par EDF les circuits de refroidissement de la centrale de Civaux, alimentés en eau brute de Vienne et non traités (seul un traitement des rejets aux UV est effectué), présentent de rares et faibles événements de proliférations de *Legionella*. Cela suggère, en complément de nos résultats, l'existence de caractéristiques inhibitrices, pour *Legionella*, intrinsèques à la qualité d'eau et qui pourraient conduire à une augmentation de la sensibilité au traitement à la monochloramine.

Par ailleurs, dans notre étude, la filtration sur membrane de porosité de 0,45 µm comme l'ajout des MES (d'un facteur 10 environ jusqu'à des concentrations élevées, comprises entre 90 et 220 mg/L de MES, selon l'eau de rivière) n'ont pas modifié la sensibilité de *Legionella* au traitement. Le rôle des MES sur l'efficacité de désinfection de *Legionella* n'est pas décrit dans la littérature. Cependant une observation similaire a été faite par Barbeau *et al.*, lors de la désinfection de spore de *B. subtilis* au chlore et au dioxyde de chlore dans des eaux naturelles (Barbeau *et al.*, 2005). La filtration sur membrane de porosité de 0,45 µm n'a pas augmenté l'efficacité de désinfection. Pour Gauthier *et al.*, malgré 24 heures de mise en contact entre des bactéries du genre *Sphingomonas* et des particules de goethite (α-Fe00H) de tailles de 10 à 50 µm, aucune protection vis-à-vis d'un traitement au chlore n'a

été observée pour les bactéries adhérées (Gauthier *et al.*, 1999). Cependant pour, Dickenson et Sansalone, les matières particulaires de type sédiments (supérieures à 75 µm) pourraient offrir une protection aux micro-organismes et avoir ainsi un effet négatif sur la désinfection ce qui ne seraient pas le cas pour des matières particulaires plus petites car les micro-organismes resteraient alors à leur surface (Dickenson and Sansalone, 2011). Pour Kahler *et al.*, la composition , la taille et la structure de ces particules seraient plus importantes que leur quantité (Kahler *et al.*, 2010). Au final, il est délicat de conclure sur cette absence d'effet en raison d'une part de l'effet controversé des MES mais également du fait que lors de notre étude la durée de mise en contact de *Legionella* avec l'eau, avant le traitement, n'a été que d'une heure contre 24 heures dans d'autres études. Dans notre étude, il a été choisi un temps de mise en contact d'une heure afin de tenter d'initier une interaction avec les MES tout en limitant la possibilité de changement physiologique chez la bactérie lors du passage d'un milieu de culture riche à une eau de rivière notamment pour les cellules en phase exponentielle. Il n'en reste pas moins que nous n'avons pas observé de protection de *Legionella* par les MES vis-à-vis du traitement monochloramine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette thèse, était d'une part, d'améliorer les connaissances sur les associations des légionelles avec les amibes dans les circuits de refroidissement et d'autre part, d'apporter des éléments pour mieux évaluer leur sensibilité au traitement à la monochloramine dans ces environnements complexes. Pour ce faire, l'étude a été articulée autour de deux questions principales:

- Quelle est l'association des légionelles dans les circuits (libres, intra-trophozoites ou intra-kystes, dans quelles amibes) ?
- Quel est l'impact du milieu environnant sur l'efficacité des traitements en fonction de l'état de ces légionelles ?

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la capacité de 12 souches d'amibes issues de 4 circuits de refroidissement de centrales électriques et appartenant aux genres amibiens *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmannella* à permettre la prolifération de 2 souches de *L. pneumophila*. Toutes les souches d'amibes se sont montrées permissives aux deux souches de *L. pneumophila* testées. De plus, nous n'avons pas observé de différences significatives de prolifération entre les différents genres amibiens. L'influence de la température a également été notable entre 25°C et 40°C : la température de 40°C a favorisé la prolifération de *Legionella*. Pour le paramètre MOI, les résultats obtenus ont montré une prolifération à MOI 10 limitée. Des essais complémentaires, notamment en présence d'autres bactéries, présentes dans les circuits, peuvent être envisagés dans le but de mieux évaluer le rôle de ce facteur et d'observer le comportement des amibes dans des conditions plus proches des circuits. Les résultats obtenus impliquent que *Legionella* a probablement la capacité à se multiplier facilement dans de nombreux hôtes, dans les circuits de refroidissement des centrales électriques.

Afin de déterminer l'état d'association de *Legionella* dans les circuits nous avons tenté de mettre en œuvre un protocole pour séparer *Legionella* selon son état d'association. Nous avons mis en évidence que la filtration est la méthode de séparation physique la plus adéquate pour la séparation de *Legionella*. Dans le but de mieux évaluer l'efficacité de notre protocole nous avons cherché à produire et à observer des *Legionella* intra-kystes, sujet à discussion dans la littérature. Malgré plusieurs tentatives nous ne sommes parvenus ni à observer ce genre d'association dans des échantillons artificiels ou dans des échantillons d'eaux de pilote ni à produire ces légionelles intra-kystes. Ceci suggère que ce type d'association ne pourrait être retrouvé que lors de conditions particulières et ne représenterait qu'une faible proportion parmi les types d'associations amibes-légionelles possibles. La mise en œuvre du protocole de séparation s'est avérée complexe du fait de plusieurs verrous technologiques et n'a finalement pas abouti à un protocole définitif. Bien que nous ayons réussi à améliorer la résistance des trophozoites, notamment ceux d'*Acanthamoeba*, à la filtration grâce à l'utilisation de Percoll, la séparation des légionelles libres et intra-amibiennes nécessite des développements supplémentaires. Des essais complémentaires sont à effectuer avec des amibes du

genre *Naegleria* pour vérifier la validité de cette méthode et d'autres sont à initier avec d'autres genres amibiens comme par exemple *Hartmannella*. Concernant la séparation des légionelles intra-kystes, le protocole testé a permis d'éliminer les légionelles libres et celles associées aux trophozoites mais les kystes d'amibes notamment ceux de *Naegleria* n'ont pu être collectés après traitement suggérant que les éventuelles légionelles qu'ils peuvent contenir ne peuvent pas à être récupérées et quantifiées. Ce protocole nécessite également des développements.

Nous nous sommes finalement intéressés à la sensibilité des *Legionella* sous différentes phases physiologiques. La sensibilité, au traitement monochloramine, des 2 souches de *L. pneumophila* testées ont été proches. Les cellules en phase exponentielle se sont avérées les plus sensibles ($Ct_{99,9\%}$ de 15,9 ± 1,3 mg.min/L, pour la souche Lens) et ce, d'un facteur 2 environ par rapport aux cellules en phase stationnaire ($Ct_{99,9\%}$ de 38,4 ± 18,9 mg.min/L, pour la souche Lens). Les cellules post-amibes ($Ct_{99,9\%}$ de 46,5 ± 6,2 mg.min/L, pour la souche Lens mais aussi une vitesse de réduction de cultivabilité plus faible) se sont avérées les moins sensibles. De plus, le mode d'action de la monochloramine étant encore flou, des essais afin de déterminer précisément ce mode d'action sont à envisager afin d'expliquer la différence de sensibilité entre les cellules issues de différentes phases physiologiques. Par exemple, l'étude du transcriptome sur des cellules traitées ou non, pourrait mettre en lumière des mécanismes de régulation mis en place suite à l'action de la monochloramine ce qui pourrait permettre de mieux comprendre son mode d'action. Des observations microscopiques, après marquage de la paroi ou d'organites cellulaires, de *Legionella* traitées pourraient également aider à mieux appréhender ce mode d'action. Ces résultats soulignent une nouvelle fois, l'importance des amibes dans l'écologie de *Legionella* car en plus de permettre une multiplication importante et rapide, le passage dans les amibes confère aux *Legionella* une sensibilité moindre au traitement à la monochloramine.

A la suite de ces essais nous avons observé l'effet de la matrice en comparant la sensibilité de *L. pneumophila* Lens dans différents états physiologiques dans trois eaux de rivières (Moselle, Loire et Vienne). L'effet de la matrice a été clairement mis en évidence dans le cas de l'eau de Vienne. La sensibilité à la monochloramine a été augmentée d'un facteur 2 pour les cellules en phase exponentielle et d'un facteur 1,2 pour les cellules en phase stationnaire. Pour les deux autres eaux, la sensibilité est restée du même ordre que celles en tampon phosphate. Ces résultats suggèrent, l'existence de caractéristiques inhibitrices, pour *Legionella*, intrinsèques à la qualité d'eau et conduisant à une augmentation de la sensibilité au traitement à la monochloramine puisque d'après EDF les circuits de refroidissement de la centrale de Civaux alimentés en eau brute de Vienne et non traitée (seul un traitement des rejets aux UV est effectué) présentent de rares et faibles événements de proliférations de *Legionella.*

Des analyses physico-chimiques plus poussées sont à réaliser pour comprendre cette sensibilité accrue dans l'eau de Vienne comme par exemple la caractérisation de la matière organique. L'étude de la communauté microbienne de cette eau, par séquençage haut débit par exemple, pourrait permettre d'identifier un ou des éventuels micro-organismes (bactéries, phytoplancton, zooplancton ou autres) présents cette eau qui pourraient éventuellement être inhibiteurs ou sécréter une toxine aux effets négatifs pour *Legionella*. Par contre nous n'avons pas observé de modification de la sensibilité au traitement suite à la filtration des eaux sur membrane de porosité de 0,45 µm ou suite à l'enrichissement des MES d'un facteur 10 environ. Les $Ct_{99,9\%}$ sont restés du même ordre pour les 3 eaux testées. Les particules de ces eaux ne semblent donc pas offrir de protection au traitement même en grande quantité. L'absence d'effet pourrait cependant être dû, dans notre cas, au temps de temps de contact limité entre *Legionella* et les MES (1 heure). Des essais avec des temps de contact plus importants sont à envisager pour les cellules en phase stationnaire pour infirmer ou confirmer ce résultat. Enfin, des essais en réacteur permettraient d'obtenir des cellules plus proches des conditions de terrain et pour lesquelles les interactions entre *Legionella* et la matrice mais aussi entre *Legionella* et la communauté microbienne seraient plus importantes.

Au final, cette étude a montré la capacité de *Legionella* à s'adapter à son hôte amibien et à proliférer au sein des amibes. Non seulement, la présence des amibes permet une prolifération rapide de *Legionella* mais la mutiplication intracellulaire de *Legionella* permet de diminuer la sensibilité de la bactérie au traitement monochloramine. La matrice a également un effet sur la sensibilité de *Legionella* à la monochloramine, par contre lors de notre étude les MES n'ont pas influé sur la sensibilité au traitement. La poursuite du développement du protocole de séparation de *Legionella* en fonction de sont état d'association apportera des éléments supplémentaires quant au mode de vie de *Legionella* dans l'environnement et permettra de mieux déterminer la sensibilité de l'ensemble de la population de *Legionella* au traitement, dans des conditions de circuits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abu Kwaik, Y., Fields, B.S., and Engleberg, N.C. (1994) Protein expression by the protozoan Hartmannella vermiformis upon contact with its bacterial parasite Legionella pneumophila. *Infect Immun* **62**: 1860-1866.

Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Harb, O.S., and Stone, B.J. (1997) Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (gspA) of Legionella pneumophila and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol Microbiol* **24**: 629-642.

Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C., and Harb, O.S. (1998) Invasion of protozoa by Legionella pneumophila and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3127-3133.

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

Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., and Taylor, M.F. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 399-451.

Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., and Alizadeh, H. (2002) Resistance of Acanthamoeba castellanii cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol* **88**: 621-623.

Al-Jasser, A.O. (2007) Chlorine decay in drinking-water transmission and distribution systems: pipe service age effect. *Water Res* **41**: 387-396.

Albrich, J.M., and Hurst, J.K. (1982) Oxidative inactivation of Escherichia coli by hypochlorous acid. Rates and differentiation of respiratory from other reaction sites. *FEBS Lett* **144**: 157-161.

Alexander, M. (1981) Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and hosts. *Annu Rev Microbiol* **35**: 113-133.

Allegra, S., Girardot, F., Grattard, F., Berthelot, P., Helbig, J.H., Pozzetto, B., and Riffard, S. (2011) Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve Legionella pneumophila serogroup 1 recovery from environmental samples. *J Appl Microbiol*.

Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C., and Frere, J. (2008) Long-term survival of Legionella pneumophila in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* **57**: 497-502.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1919-1925.

Amaro, F., Gilbert, J.A., Owens, S., Trimble, W., and Shuman, H.A. (2012) Whole-genome sequence of the human pathogen Legionella pneumophila serogroup 12 strain 570-CO-H. *J Bacteriol* **194**: 1613-1614.

Anderson, R.V., Elliot, E.T., McClellan, J.F., Coleman, D.C., Cole, C.V., and Hunt, H.W. (1978) Trophic Interactions in Soils as They Affect Energy and Nutrient Dynamics. III. Biotic Interactions of Bacteria, Amoebae,and Nematodes. *microbial ecology* **4**: 361-371.

Arvand, M., Jungkind, K., and 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. *Environ Microbiol* **1**: 283-293.

Avron, B., Bracha, R., Deutsch, M.R., and Mirelman, D. (1983) Entamoeba invadens and E. histolytica: separation and purification of precysts and cysts by centrifugation on discontinuous density gradients of Percoll. *Exp Parasitol* **55**: 265-269.

Ayyildiz, O., Ileri, B., and Sanik, S. (2009) Impacts of water organic load on chlorine dioxide disinfection efficacy. *J Hazard Mater* **168**: 1092-1097.

B

Bachman, M.A., and Swanson, M.S. (2001) RpoS co-operates with other factors to induce Legionella pneumophila virulence in the stationary phase. *Mol Microbiol* **40**: 1201-1214.

Ballard, A.L., Fry, N.K., Chan, L., Surman, S.B., Lee, J.V., Harrison, T.G., and Towner, K.J. (2000) Detection of Legionella pneumophila using a real-time PCR hybridization assay. *J Clin Microbiol* **38**: 4215-4218.

Barbeau, B., Huffman, D., Mysore, C., Desjardins, R., Clement, B., and Prevost, M. (2004) Examination of discrete and counfouting effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus suptilis* spores with chlorine dioxide. *journal of environmental engineering science* **4**: 139-151.

Barbeau, B., Desjardins, R., Mysore, C., and Prevost, M. (2005) Impacts of water quality on chlorine and chlorine dioxide efficacy in natural waters. *Water Res* **39**: 2024-2033.

Barbeau, J., and Buhler, T. (2001) Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol* **152**: 753-760.

Bargellini, A., Marchesi, I., Righi, E., Ferrari, A., Cencetti, S., Borella, P., and Rovesti, S. (2011) Parameters predictive of Legionella contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Res* **45**: 2315-2321.

Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., and Gilbert, P. (1992) Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2420-2425.

Barker, J., Scaife, H., and Brown, M.R. (1995) Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of Legionella pneumophila. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2684-2688.

Barrabeig, I., Rovira, A., Garcia, M., Oliva, J.M., Vilamala, A., Ferrer, M.D., Sabria, M., and Dominguez, A. (2010) Outbreak of Legionnaires' disease associated with a supermarket mist machine. *Epidemiol Infect* **138**: 1823-1828.

Barrett, R.A., and Alexander, M. (1977) Resistance of cysts of amoebae to microbial decomposition. *Appl Environ Microbiol* **33**: 670-674.

Beaute, J., Zucs, P., and de Jong, B. (2013) Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. *Euro Surveill* **18**: 20417.

Bej, A.K., Mahbubani, M.H., and 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.

Bej, A.K. (2003) Molecular based methods for the detection of microbial pathogens in the environment. *J Microbiol Methods* **53**: 139-140.

Benarde, M.A., Snow, W.B., Olivieri, V.P., and Davidson, B. (1967) Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Appl Microbiol* **15**: 257-265.

Benhamou, D., Bru, J.P., Chidiac, C., Etienne, J., Leophonte, P., Marty, N., Poirier, R., and Rouquet, R.M. (2005) [Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment]. *Med Mal Infect* **35**: 1-5.

Benson, R.F., and Fields, B.S. (1998) Classification of the genus Legionella. *Semin Respir Infect* **13**: 90-99.

Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W., and Ashburn, R.J. (1998) Production of respirable vesicles containing live Legionella pneumophila cells by two Acanthamoeba spp. *Appl Environ Microbiol* **64**: 279-286.

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., and Farone, M.B. (2006) Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ Sci Technol* **40**: 7440-7444.

Berry, D., Holder, D., Xi, C., and Raskin, L. (2010) Comparative transcriptomics of the response of Escherichia coli to the disinfectant monochloramine and to growth conditions inducing monochloramine resistance. *Water Res* **44**: 4924-4931.

Bichai, F., Payment, P., and Barbeau, B. (2008) Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: a review. *Can J Microbiol* **54**: 509-524.

Bodet, C., Sahr, T., Dupuy, M., Buchrieser, C., and Hechard, Y. (2012) Legionella pneumophila transcriptional response to chlorine treatment. *Water Res* **46**: 808-816.

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., and Ribera D'Alcala, G. (2004) Legionella infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis* **10**: 457-464.

Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., and Messi, P. (2005) Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* **11**: 355-380.

Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M.H., and Hechard, Y. (2007) Long-term survival of Legionella pneumophila associated with Acanthamoeba castellanii vesicles. *Environ Microbiol* **9**: 1341-1344.

Bowers, B., and Korn, E.D. (1968) The fine structure of Acanthamoeba castellanii. I. The trophozoite. *J Cell Biol* **39**: 95-111.

Bozue, J.A., and Johnson, W. (1996) Interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**: 668-673.

Bracha, R., Kobiler, D., and Mirelman, D. (1982) Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of Entamoeba histolytica. *Infect Immun* **36**: 396-406.

Brandt, P.W., and Pappas, G.D. (1960) AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF PINOCYTOSIS IN AMEBA : I. The Surface Attachment Phase. *J Biophys Biochem Cytol* **8**: 675-687.

Braoudaki, M., and Hilton, A.C. (2004) Adaptive resistance to biocides in Salmonella enterica and Escherichia coli O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* **42**: 73-78.

Brassinga, A.K., Kinchen, J.M., Cupp, M.E., Day, S.R., Hoffman, P.S., and Sifri, C.D. (2010) Caenorhabditis is a metazoan host for Legionella. *Cell Microbiol* **12**: 343-361.

Brock, D.A., Douglas, T.E., Queller, D.C., and Strassmann, J.E. (2011) Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature* **469**: 393-396.

Brown, T.J., Cursons, R.T., and Keys, E.A. (1982) Amoebae from antarctic soil and water. *Appl Environ Microbiol* **44**: 491-493.

Buchbinder, S., Trebesius, K., and 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**: 241-245.

Buse, H.Y., and Ashbolt, N.J. (2011) Differential growth of Legionella pneumophila strains within a range of amoebae at various temperatures associated with in-premise plumbing. *Lett Appl Microbiol*.

Buse, H.Y., Brehm, A., Santo Domingo, J.W., and Ashbolt, N.J. (2011) Screening-level assays for potentially human-infectious environmental Legionella spp. *J Microbiol* **49**: 200-207.

Buse, H.Y., Donohue, M.J., and Ashbolt, N.J. (2013) Hartmannella vermiformis Inhibition of Legionella pneumophila Cultivability. *Microb Ecol*.

Byers, T.J., Kim, B.G., King, L.E., and Hugo, E.R. (1991) Molecular aspects of the cell cycle and encystment of Acanthamoeba. *Rev Infect Dis* **13 Suppl 5**: S373-384.

Byrne, B., and Swanson, M.S. (1998) Expression of Legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* **66**: 3029-3034.

C

Campese, C., Bitar, D., Jarraud, S., Maine, C., Forey, F., Etienne, J., Desenclos, J.C., Saura, C., and Che, D. (2010) Progress in the surveillance and control of Legionella infection in France, 1998-2008. *Int J Infect Dis*.

Cazalet, C., Rusniok, C., Bruggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichit, M., Jarraud, S., Bouchier, C., Vandenesch, F., Kunst, F., Etienne, J., Glaser, P., and Buchrieser, C. (2004) Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**: 1165-1173.

Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2005) [What do we learn from the genome of Legionella pneumophila?]. *Med Sci (Paris)* **21**: 455-457.

Chang, C.W., Hwang, Y.H., Cheng, W.Y., and Chang, C.P. (2007) Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved Legionella pneumophila in warm water. *J Appl Microbiol* **102**: 1636-1644.
Chang, C.W., Kao, C.H., and Liu, Y.F. (2009) Heterogeneity in chlorine susceptibility for Legionella pneumophila released from Acanthamoeba and Hartmannella. *J Appl Microbiol* **106**: 97-105.
Chang, S.L. (1978) Resistance of pathogenic Naegleria to some common physical and chemical agents. *Appl Environ Microbiol* **35**: 368-375.
Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Gonzalez-Lazaro, M., Gonzalez-Robles, A., Cedillo-Rivera, R., Bonilla, P., and Martinez-Palomo, A. (2007) Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. *Parasitol Res* **100**: 1169-1175.
Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Castanon, G., Bonilla, P., Gonzalez-Lazaro, M., Hernandez-Martinez, D., Salazar-Villatoro, L., Esparza-Garcia, A., Martinez-Palomo, A., and Ortega-Pierres, G. (2009) Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in Naegleria sp. *J Eukaryot Microbiol* **56**: 66-72.
Chavez-Munguia, B., Salazar-Villatoro, L., Lagunes-Guillen, A., Omana-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M., and Martinez-Palomo, A. (2013) Acanthamoeba castellanii cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol Res* **112**: 1125-1130.
Che, D., Campese, C., and Jarraud, S. (2011) [Legionella and legionnaires' disease: What do we know?]. *Pathol Biol (Paris)* **59**: 134-136.
Chen, S., Hicks, L., Yuen, M., Mitchell, D., and Gilbert, G.L. (1994) Serological cross-reaction between Legionella spp. and Capnocytophaga ochracea by using latex agglutination test. *J Clin Microbiol* **32**: 3054-3055.
Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M., Asamani, G., Hill, K., Nuara, J., Feder, M., Rineer, J., Greenberg, J.J., Steshenko, V., Park, S.H., Zhao, B., Teplitskaya, E., Edwards, J.R., Pampou, S., Georghiou, A., Chou, I.C., Iannuccilli, W., Ulz, M.E., Kim, D.H., Geringer-Sameth, A., Goldsberry, C., Morozov, P., Fischer, S.G., Segal, G., Qu, X., Rzhetsky, A., Zhang, P., Cayanis, E., De Jong, P.J., Ju, J., Kalachikov, S., Shuman, H.A., and Russo, J.J. (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen Legionella pneumophila. *Science* **305**: 1966-1968.
Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**: 451-485.
Cianciotto, N.P., and Fields, B.S. (1992) Legionella pneumophila mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5188-5191.
Cianciotto, N.P. (2009) Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from Legionella pneumophila. *Future Microbiol* **4**: 797-805.
Cimetiere, N. (2009) etude de la décomposition de la monochloramine en milieu aqueux et réactivité avec des composés phénoliques.
Cimetiere, N., Dossier-Berne, F., and De Laat, J. (2009) Monochloramination of resorcinol: mechanism and kinetic modeling. *Environ Sci Technol* **43**: 9380-9385.
Cirillo, J.D., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1994) Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion. *Infect Immun* **62**: 3254-3261.
Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999) Intracellular growth in Acanthamoeba castellanii affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **67**: 4427-4434.
Clarke, M., Lohan, A.J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., Bertelli, C., Schilde, C., Kianianmomeni, A., Burglin, T.R., Frech, C., Turcotte, B., Kopec, K.O., Synnott, J.M., Choo, C., Paponov, I., Finkler, A., Heng Tan, C.S., Hutchins, A.P., Weinmeier, T., Rattei, T., Chu, J.S., Gimenez, G., Irimia, M., Rigden, D.J., Fitzpatrick, D.A., Lorenzo-Morales, J., Bateman, A., Chiu, C.H., Tang, P., Hegemann, P., Fromm, H., Raoult, D., Greub, G., Miranda-Saavedra, D., Chen, N., Nash, P., Ginger, M.L., Horn, M., Schaap, P., Caler, L., and Loftus, B.J. (2013) Genome of Acanthamoeba castellanii highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* **14**: R11.
Cooper, I.R., and Hanlon, G.W. (2010) Resistance of Legionella pneumophila serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect* **74**: 152-159.

Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., and Thomas, V. (2010) Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microbiol* **48**: 2689-2697.
Coulon, C., Dechamps, N., Meylheuc, T., Collignon, A., McDonnell, G., and Thomas, V. (2012) The effect of in vitro growth conditions on the resistance of Acanthamoeba cysts. *J Eukaryot Microbiol* **59**: 198-205.
Critchley, M., and Bentham, R. (2009) The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. *J Appl Microbiol* **106**: 784-789.
Culberston, C.G., Smith, J.W., and Minner, J.R. (1968) Acanthamoeba: Observations on Animal Pathogenicity. *Science* **127**: 1506.
Cunliffe, D.A. (1990) Inactivation of Legionella pneumophila by monochloramine. *J Appl Bacteriol* **68**: 453-459.
Cursons, R.T., Brown, T.J., and Keys, E.A. (1980) Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. *Appl Environ Microbiol* **40**: 62-66.

D

De Beer, D., Srinivasan, R., and Stewart, P.S. (1994) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4339-4344.
Debroy, S., Aragon, V., Kurtz, S., and Cianciotto, N.P. (2006) Legionella pneumophila Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infect Immun* **74**: 5152-5160.
Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A., and Ollevier, F. (2003) A detection method for Legionella spp in (cooling) water: fluorescent in situ hybridisation (FISH) on whole bacteria. *Water Sci Technol* **47**: 143-146.
Declerck, P., Behets, J., Delaedt, Y., Margineanu, A., Lammertyn, E., and Ollevier, F. (2005) Impact of non-Legionella bacteria on the uptake and intracellular replication of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii and Naegleria lovaniensis. *Microb Ecol* **50**: 536-549.
Declerck, P., Behets, J., De Keersmaecker, B., and Ollevier, F. (2007) Receptor-mediated uptake of Legionella pneumophila by Acanthamoeba castellanii and Naegleria lovaniensis. *J Appl Microbiol* **103**: 2697-2703.
Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., and Ollevier, F. (2009) Replication of Legionella pneumophila in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol Res* **164**: 593-603.
Declerck, P., Vanysacker, L., Hulsmans, A., Lambert, N., Liers, S., and Ollevier, F. (2010) Evaluation of power ultrasound for disinfection of both Legionella pneumophila and its environmental host Acanthamoeba castellanii. *Water Res* **44**: 703-710.
Delgado-Viscogliosi, P., Solignac, L., and 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**: 3502-3512.
Dey, R., Bodennec, J., Mameri, M.O., and Pernin, P. (2009) Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium Legionella pneumophila. *FEMS Microbiol Lett* **290**: 10-17.
Di Giovanni, G.D., Hashemi, F.H., Shaw, N.J., Abrams, F.A., LeChevallier, M.W., and Abbaszadegan, M. (1999) Detection of infectious Cryptosporidium parvum oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3427-3432.
Dickenson, J.A., and Sansalone, J.J. (2011) Distribution and disinfection of bacterial loadings associated with particulate matter fractions transported in urban wet weather flows. *Water Res* **46**: 6704-6714.
Diederen, B.M., de Jong, C.M., Aarts, I., Peeters, M.F., and van der Zee, A. (2007) Molecular evidence for the ubiquitous presence of Legionella species in Dutch tap water installations. *J Water Health* **5**: 375-383.
Diederen, B.M. (2008) Legionella spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* **56**: 1-12.

Domek, M.J., LeChevallier, M.W., Cameron, S.C., and McFeters, G.A. (1984) Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. *Appl Environ Microbiol* **48**: 289-293.
Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**: 881-890.
Doré, M. (1989) Chimie des oxydants - traitements des eaux. *Ed. Lavoisier, Paris*.
Dudley, R., Jarroll, E.L., and Khan, N.A. (2009) Carbohydrate analysis of Acanthamoeba castellanii. *Exp Parasitol* **122**: 338-343.
Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Menard-Szczebara, F., Oberti, S., Rodier, M.H., Soreau, S., Wallet, F., and Hechard, Y. (2011) Efficiency of water disinfectants against Legionella pneumophila and Acanthamoeba. *Water Res* **45**: 1087-1094.
Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Rodier, M.H., Soreau, S., and Hechard, Y. (2013) Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int J Hyg Environ Health*.

E

Ewann, F., and Hoffman, P.S. (2006) Cysteine metabolism in Legionella pneumophila: characterization of an L-cystine-utilizing mutant. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3993-4000.

F

Fallon, R.J., and Rowbotham, T.J. (1990) Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to Legionella micdadei associated with use of a whirlpool. *J Clin Pathol* **43**: 479-483.
Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C., and Baine, W.B. (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* **10**: 437-441.
Fettes, P.S., Forsbach-Birk, V., Lynch, D., and Marre, R. (2001) Overexpresssion of a Legionella pneumophila homologue of the E. coli regulator csrA affects cell size, flagellation, and pigmentation. *Int J Med Microbiol* **291**: 353-360.
Fields, B.S., Sanden, G.N., Barbaree, J.M., Morrill, W., Wadowsky, R.M., White, E., and Feeley, J. (1989) Intracellular Multiplication of Legionella pneumophila in Amoebae Isolated from Hospital Hot Water Tanks. *Curr Microbiol* **18**: 131-137.
Fields, B.S. (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* **4**: 286-290.
Fields, B.S., Benson, R.F., and Besser, R.E. (2002) Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* **15**: 506-526.
Fisher, I., Kastl, G., and Sathasivan, A. (2012) A suitable model of combined effects of temperature and initial condition on chlorine bulk decay in water distribution systems. *Water Res* **46**: 3293-3303.
Flemming, H.C. (2002) Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 629-640.
Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., and Pope, D.H. (1981) Ecological distribution of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **41**: 9-16.
Fouque, E., Trouilhe, M.C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.H., and Hechard, Y. (2012) Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryot Cell* **11**: 382-387.
Fowler, M., and Carter, R.F. (1965) Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp.: a preliminary report. *Br Med J* **2**: 740-742.
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., Shepard, C.C., and Brachman, P.S. (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**: 1189-1197.
Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Seyedirashti, S., Bergeron, D.L., and Lindquist, T.D. (1993) Occurrence of bacterial endosymbionts in Acanthamoeba spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* **31**: 1122-1126.

Fritz-Laylin, L.K., Prochnik, S.E., Ginger, M.L., Dacks, J.B., Carpenter, M.L., Field, M.C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., Shu, S., Neupane, R., Cipriano, M., Mancuso, J., Tu, H., Salamov, A., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., Grigoriev, I.V., Cande, W.Z., Fulton, C., Rokhsar, D.S., and Dawson, S.C. (2010) The genome of Naegleria gruberi illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**: 631-642.

Fry, N.K., Warwick, S., Saunders, N.A., and Embley, M. (1991) The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *Journal of general mycrobiology* **137**: 1215-1222.

G

Gagnon, G.A., Rand, J.L., O'Leary K, C., Rygel, A.C., Chauret, C., and Andrews, R.C. (2005) Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water Res* **39**: 1809-1817.

Gao, L.Y., and Abu Kwaik, Y. (1999) Activation of caspase 3 during Legionella pneumophila-induced apoptosis. *Infect Immun* **67**: 4886-4894.

Garcia, A., Goni, P., Cieloszyk, J., Fernandez, M.T., Calvo-Begueria, L., Rubio, E., Fillat, M.F., Peleato, M.L., and Clavel, A. (2013) Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ Sci Technol* **47**: 3132-3140.

Garcia, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., and Abu Kwaik, Y. (2007) Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection. *Environ Microbiol* **9**: 1267-1277.

Garcia, M.T., Baladron, B., Gil, V., Tarancon, M.L., Vilasau, A., Ibanez, A., Elola, C., and Pelaz, C. (2008) Persistence of chlorine-sensitive Legionella pneumophila in hyperchlorinated installations. *J Appl Microbiol* **105**: 837-847.

Garduno, R.A., Quinn, F.D., and Hoffman, P.S. (1998) HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of Legionella pneumophila. *Can J Microbiol* **44**: 430-440.

Garduno, R.A., Garduno, E., Hiltz, M., and Hoffman, P.S. (2002) Intracellular growth of Legionella pneumophila gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun* **70**: 6273-6283.

Gauthier, V., Redercher, S., and Block, J.C. (1999) Chlorine inactivation of Sphingomonas cells attached to goethite particles in drinking water. *Appl Environ Microbiol* **65**: 355-357.

Gimenez, G., Bertelli, C., Moliner, C., Robert, C., Raoult, D., Fournier, P.E., and Greub, G. (2011) Insight into cross-talk between intra-amoebal pathogens. *BMC Genomics* **12**: 542.

Gomez-lus, R., Lomba, E., and E. & Gomez-lus, P. (1993) In vitro antagonistic activity of Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, and Aeromonas spp. against Legionella spp. *American Society for Microbiology*: 265-267.

Goudot, S., Herbelin, P., Mathieu, L., Soreau, S., Banas, S., and Jorand, F. (2012) Growth dynamic of Naegleria fowleri in a microbial freshwater biofilm. *Water Res* **46**: 3958-3966.

Greub, G., and Raoult, D. (2003) Morphology of Legionella pneumophila according to their location within Hartmanella vermiformis. *Res Microbiol* **154**: 619-621.

Greub, G., and Raoult, D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413-433.

Griffin, J.L. (1983) The pathogenic amoeboflagellate Naegleria fowleri: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J Protozool* **30**: 403-409.

Grimm, D., Merkert, H., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Hacker, J., and Brand, B.C. (1998) Specific detection of Legionella pneumophila: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2686-2690.

Gryseels, S., Amissah, D., Durnez, L., Vandelannoote, K., Leirs, H., De Jonckheere, J., Silva, M.T., Portaels, F., Ablordey, A., and Eddyani, M. (2012) Amoebae as potential environmental hosts for Mycobacterium ulcerans and other mycobacteria, but doubtful actors in Buruli ulcer epidemiology. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1764.

H

Hambleton, P., Broster, M.G., Dennis, P.J., Henstridge, R., Fitzgeorge, R., and Conlan, J.W. (1983) Survival of virulent Legionella pneumophila in aerosols. *J Hyg (Lond)* **90**: 451-460.

Hamilton, E., Seal, D.V., and Hay, J. (1996) Comparison of chlorine and chlorine dioxide disinfection for control of Legionella in a hospital potable water supply. *J Hosp Infect* **32**: 156-160.

Hammer, B.K., Tateda, E.S., and Swanson, M.S. (2002) A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **44**: 107-118.

Hanrahan, J.P., Morse, D.L., Scharf, V.B., Debbie, J.G., Schmid, G.P., McKinney, R.M., and Shayegani, M. (1987) A community hospital outbreak of legionellosis. Transmission by potable hot water. *Am J Epidemiol* **125**: 639-649.

Harb, O.S., Venkataraman, C., Haack, B.J., Gao, L.Y., and Kwaik, Y.A. (1998) Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, Legionella pneumophila, by protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol* **64**: 126-132.

Hartemann, P., and Hautemaniere, A. (2011) Legionellosis prevention in France. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **54**: 724-727.

Heller, R., Holler, C., Sussmuth, R., and Gundermann, K.O. (1998) Effect of salt concentration and temperature on survival of Legionella pneumophila. *Lett Appl Microbiol* **26**: 64-68.

Hindre, T., Bruggemann, H., Buchrieser, C., and Hechard, Y. (2008) Transcriptional profiling of Legionella pneumophila biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* **154**: 30-41.

Hughes, R., Heaselgrave, W., and Kilvington, S. (2003) Acanthamoeba polyphaga strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3080-3084.

Husmann, L.K., and Johnson, W. (1994) Cytotoxicity of extracellular Legionella pneumophila. *Infect Immun* **62**: 2111-2114.

Hussong, D., Cowell, R.R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A.D., Wenier, R.M., and Burge, W.D. (1987) Viable Legionella pneumophila but not detectable by culture on agar medium. *Biotechnology* **5**: 947-950.

Huws, S.A., McBain, A.J., and Gilbert, P. (2005) Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J Appl Microbiol* **98**: 238-244.

J

Jacangelo, J.G., Olivieri, V.P., and Kawata, K. (1991) Investigating the mechanism of inactivation of Escherichia coli B by monochloramine. *journal AWWA* **83**: 80-87.

Jackson, D.P., Lewis, F.A., Taylor, G.R., Boylston, A.W., and Quirke, P. (1990) Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* **43**: 499-504.

Jakubek, D., Guillaume, C., Binet, M., Leblon, G., and Le Brun, M. (2013a) Susceptibility of legionella strains to the chlorinated biocide, monochloramine. *Microbes and environments* **23**.

Jakubek, D., Le Brun, M., Leblon, G., Dubow, M., and Binet, M. (2013b) The impact of monochloramine on the diversity and dynamics of Legionella pneumophila subpopulations in a nuclear power plant cooling circuit. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 302-312.

Jansa, J.M., Cayla, J.A., Ferrer, D., Gracia, J., Pelaz, C., Salvador, M., Benavides, A., Pellicer, T., Rodriguez, P., Garces, J.M., Segura, A., Guix, J., and Plasencia, A. (2002) An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: importance of the first 24 hours in the investigation. *Int J Tuberc Lung Dis* **6**: 831-838.

Jensen, U.B., Owens, D.M., Pedersen, S., and Christensen, R. (2010) Zinc fixation preserves flow cytometry scatter and fluorescence parameters and allows simultaneous analysis of DNA content and synthesis, and intracellular and surface epitopes. *Cytometry A* **77**: 798-804.

John, D.T., and Howard, M.J. (1995) Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res* **81**: 193-201.

Joly, P., Falconnet, P.A., Andre, J., Weill, N., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Maurin, M., Etienne, J., and Jarraud, S. (2006) Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2801-2808.

Junli, H., Li, W., Nanqui, R., Fang, M., and Juli (1997) Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Res* **31**: 607-613.

K

Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M., and Friedman, M.G. (2001) Infection of Acanthamoeba polyphaga with Simkania negevensis and S. negevensis survival within amoebal cysts. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4789-4795.

Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., and Hill, V.R. (2010) Source water quality effects on monochloramine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. *Water Res* **45**: 1745-1751.

Kao, P.M., Tung, M.C., Hsu, B.M., Hsu, S.Y., Huang, J.T., Liu, J.H., and Huang, Y.L. (2012) Differential Legionella spp. survival between intracellular and extracellular forms in thermal spring environments. *Environ Sci Pollut Res Int* **20**: 3098-3106.

Kao, P.M., Tung, M.C., Hsu, B.M., Chou, M.Y., Yang, H.W., She, C.Y., and Shen, S.M. (2013a) Quantitative detection and identification of Naegleria spp. in various environmental water samples using real-time quantitative PCR assay. *Parasitol Res* **112**: 1467-1474.

Kao, P.M., Tung, M.C., Hsu, B.M., Tsai, H.L., She, C.Y., Shen, S.M., and Huang, W.C. (2013b) Real-time PCR method for the detection and quantification of Acanthamoeba species in various types of water samples. *Parasitol Res* **112**: 1131-1136.

Karr, D.E., Bibb, W.F., and Moss, C.W. (1982) Isoprenoid quinones of the genus Legionella. *J Clin Microbiol* **15**: 1044-1048.

Khan, N.A. (2006) Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 564-595.

Kilvington, S., and Price, J. (1990) Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* **68**: 519-525.

Kilvington, S., and Beeching, J. (1995) Development of a PCR for identification of Naegleria fowleri from the environment. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3764-3767.

Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., and Kendall, A.M. (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. *Water Res* **36**: 4433-4444.

King, C.H., Shotts, E.B., Jr., Wooley, R.E., and Porter, K.G. (1988) Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol* **54**: 3023-3033.

Kirschner, A.K., Rameder, A., Schrammel, B., Indra, A., Farnleitner, A.H., and Sommer, R. (2012) Development of a new CARD-FISH protocol for quantification of Legionella pneumophila and its application in two hospital cooling towers. *J Appl Microbiol* **112**: 1244-1256.

Koide, M., Saito, A., Kusano, N., and Higa, F. (1993) Detection of Legionella spp. in cooling tower water by the polymerase chain reaction method. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1943-1946.

Koide, M., Arakaki, N., and Saito, A. (2001) Distribution of Legionella longbeachae and other legionellae in Japanese potting soils. *J Infect Chemother* **7**: 224-227.

Kozak, N.A., Buss, M., Lucas, C.E., Frace, M., Govil, D., Travis, T., Olsen-Rasmussen, M., Benson, R.F., and Fields, B.S. (2010) Virulence factors encoded by Legionella longbeachae identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. *J Bacteriol* **192**: 1030-1044.

Kuchta, J.M., States, S.J., McGlaughlin, J.E., Overmeyer, J.H., Wadowsky, R.M., McNamara, A.M., Wolford, R.S., and Yee, R.B. (1985) Enhanced chlorine resistance of tap water-adapted Legionella pneumophila as compared with agar medium-passaged strains. *Appl Environ Microbiol* **50**: 21-26.

Kuchta, J.M., Navratil, J.S., Shepherd, M.E., Wadowsky, R.M., Dowling, J.N., States, S.J., and Yee, R.B. (1993) Impact of Chlorine and Heat on the Survival of Hartmannella vermiformis and Subsequent Growth of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **59**: 4096-4100.

Kuiper, M.W., Wullings, B.A., Akkermans, A.D., Beumer, R.R., and van der Kooij, D. (2004) Intracellular proliferation of Legionella pneumophila in Hartmannella vermiformis in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6826-6833.

Kuiper, M.W., Valster, R.M., Wullings, B.A., Boonstra, H., Smidt, H., and van der Kooij, D. (2006) Quantitative detection of the free-living amoeba Hartmannella vermiformis in surface water by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5750-5756.

Kustnetsov, J.M., Martikainen, P.J., Jousimies-Somer, H.R., Vaisanen, M.J., Tulkki, A.I., and Nevalainem, A.I. (1993) Physical, Chemical and Microbiological Water Characteristics Associated with the Occurrence of Legionella in Cooling Tower Systems.

L

Lambert, M.A., and Moss, C.W. (1989) Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 Legionella species. *J Clin Microbiol* **27**: 465-473.

Lamrabet, O., Mba Medie, F., and Drancourt, M. (2012) Acanthamoeba polyphaga-enhanced growth of Mycobacterium smegmatis. *PLoS One* **7**: e29833.

Landeen, L.K., Yahya, M.T., and Gerba, C.P. (1989) Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **55**: 3045-3050.

Lasheras, A., Boulestreau, H., Rogues, A.M., Ohayon-Courtes, C., Labadie, J.C., and 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**: 520-525.

Lau, H.Y., and Ashbolt, N.J. (2009) The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol* **107**: 368-378.

Lawrence, C., Reyrolle, M., Dubrou, S., Forey, F., Decludt, B., Goulvestre, C., Matsiota-Bernard, P., Etienne, J., and 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. *J Clin Microbiol* **37**: 2652-2655.

Le Calvez, T., Trouilhe, M.C., Humeau, P., Moletta-Denat, M., Frere, J., and Hechard, Y. (2012) Detection of free-living amoebae by using multiplex quantitative PCR. *Mol Cell Probes* **26**: 116-120.

LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D., and Lee, R.G. (1988) Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol* **54**: 649-654.

LeChevallier, M.W., and Au, K.K. (2004) Water treatment and pathogen control. *World Health Organization*.

Lee, W.H., Wahman, D.G., Bishop, P.L., and Pressman, J.G. (2011) Free chlorine and monochloramine application to nitrifying biofilm: comparison of biofilm penetration, activity, and viability. *Environ Sci Technol* **45**: 1412-1419.

Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Lampola, T., Hirvonen, A., Vartiainen, T., and Martikainen, P.J. (2005) Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems. *Water Res* **39**: 1962-1971.

Lemgruber, L., Lupetti, P., De Souza, W., Vommaro, R.C., and da Rocha-Azevedo, B. (2010) The fine structure of the Acanthamoeba polyphaga cyst wall. *FEMS Microbiol Lett* **305**: 170-176.

Lin, Y.S., Stout, J.E., Yu, V.L., and Vidic, R.D. (1998) Disinfection of water distribution systems for Legionella. *Semin Respir Infect* **13**: 147-159.

Linder, M., Winiecka-Krusnell, J., and Linder, E. (2002) Use of recombinant cellulose-binding domains of Trichoderma reesei cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2503-2508.

Lorenzo-Morales, J., and Maciver, S.K. (2006) Long-term, low-maintenance storage of Acanthamoeba strains. *Parasitol Res* **99**: 743-745.

Lorenzo-Morales, J., Martin-Navarro, C.M., Lopez-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Pinero, J.E., and Valladares, B. (2013) Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol* **29**: 181-187.

Loret, J.F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A.J., McCoy, W.F., and Levi, Y. (2005) Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and Legionella control. *J Water Health* **3**: 423-433.

Loret, J.F., and Greub, G. (2010) Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health* **213**: 167-175.

Luo, Z.Q. (2011) Striking a balance: modulation of host cell death pathways by legionella pneumophila. *Front Microbiol* **2**: 36.
Lykidis, D., Van Noorden, S., Armstrong, A., Spencer-Dene, B., Li, J., Zhuang, Z., and Stamp, G.W. (2007) Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. *Nucleic Acids Res* **35**: e85.

M

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J., and Atlas, R.M. (1990) Detection of Legionella with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol Cell Probes* **4**: 175-187.
Maillard, J.Y. (2007) Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *J Hosp Infect* **65 Suppl 2**: 60-72.
Malato, S., Fernandez-ibanez, P., Maldonado, M.I., Blanco, J., and Gernjak, W. (2009) Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today* **147**: 1-59.
Mallegol, J., Duncan, C., Prashar, A., So, J., Low, D.E., Terebeznik, M., and Guyard, C. (2012) Essential roles and regulation of the Legionella pneumophila collagen-like adhesin during biofilm formation. *PLoS One* **7**: e46462.
Manz, W., Amann, R., Szewzyk, R., Szewzyk, U., Stenstrom, T.A., Hutzler, P., and Schleifer, K.H. (1995) In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* **141 (Pt 1)**: 29-39.
Marchesi, I., Marchegiano, P., Bargellini, A., Cencetti, S., Frezza, G., Miselli, M., and Borella, P. (2011) Effectiveness of different methods to control legionella in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. *J Hosp Infect* **77**: 47-51.
Matsuo, J., Hayashi, Y., Nakamura, S., Sato, M., Mizutani, Y., Asaka, M., and Yamaguchi, H. (2008) Novel Parachlamydia acanthamoebae quantification method based on coculture with amoebae. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6397-6404.
Matz, C., Moreno, A.M., Alhede, M., Manefield, M., Hauser, A.R., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2008) Pseudomonas aeruginosa uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *Isme J* **2**: 843-852.
McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., and Dowdle, W.R. (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**: 1197-1203.
Mekkour, M., Ben Driss, E., Tai, J., and Cohen, N. (2013) *Legionella pneumophila* : an environmental organism and accidental pathogen. *International journal of science and technology* **2**: 187-196.
Messi, P., Bargellini, A., Anacarso, I., Marchesi, I., de Niederhausern, S., and Bondi, M. (2013) Protozoa and human macrophages infection by Legionella pneumophila environmental strains belonging to different serogroups. *Arch Microbiol* **195**: 89-96.
Miething, F., Hering, S., Hanschke, B., and Dressler, J. (2006) Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *J Histochem Cytochem* **54**: 371-374.
Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T., and 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**: 2489-2494.
Mogoa, E., Bodet, C., Legube, B., and Hechard, Y. (2010) Acanthamoeba castellanii: cellular changes induced by chlorination. *Exp Parasitol* **126**: 97-102.
Mogoa, E., Bodet, C., Morel, F., Rodier, M.H., Legube, B., and Hechard, Y. (2011) Cellular response of the amoeba Acanthamoeba castellanii to chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine treatments. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4974-4980.
Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L., and Kwaik, Y.A. (2004) Cell biology of the intracellular infection by Legionella pneumophila. *Microbes Infect* **6**: 129-139.
Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., and Abu Kwaik, Y. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**: 20-28.

Molofsky, A.B., and Swanson, M.S. (2003) Legionella pneumophila CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol Microbiol* **50**: 445-461.
Molofsky, A.B., and Swanson, M.S. (2004) Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Mol Microbiol* **53**: 29-40.
Morin, P., Camper, A., Jones, W., Gatel, D., and Goldman, J.C. (1996) Colonization and disinfection of biofilms hosting coliform-colonized carbon fines. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4428-4432.
Morton, L.H.G., Greenway, D.L.A., Gaylarde, C.C., and Surman, S.B. (1998) Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocide. *International biodeterioration & biodegradation* **41**: 247-259.
Moss, C.W., Weaver, R.E., Dees, S.B., and Cherry, W.B. (1977) Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires disease. *J Clin Microbiol* **6**: 140-143.
Mouchtouri, V.A., Goutziana, G., Kremastinou, J., and Hadjichristodoulou, C. (2009) Legionella species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control* **38**: 50-55.
Mouchtouri, V.A., Goutziana, G., Kremastinou, J., and Hadjichristodoulou, C. (2010) Legionella species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control* **38**: 50-55.
Muder, R.R., Yu, V.L., and Woo, A.H. (1986) Mode of transmission of Legionella pneumophila. A critical review. *Arch Intern Med* **146**: 1607-1612.
Muraca, P., Stout, J.E., and Yu, V.L. (1987) Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing Legionella pneumophila within a model plumbing system. *Appl Environ Microbiol* **53**: 447-453.
Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., and Donlan, R.M. (2001) Role of biofilms in the survival of Legionella pneumophila in a model potable-water system. *Microbiology* **147**: 3121-3126.

N

Nagerson, and Peterson (1980) a guide for collecting, documenting and preparing mammal specimens for scientific research. *mammal collector's manual*.
Narkis, N., Armon, R., Offer, R., Orshansky, F., and Friedland, E. (1995) Effect of suspended solids on wastewater disinfection efficiency by chlorine dioxide. *Water Res* **29**: 227-236.
Ng, D.L., Koh, B.B., Tay, L., and 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**: 214-216.
Norton, C.D., and LeChevallier, M.W. (2000) A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl Environ Microbiol* **66**: 268-276.
Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L., and Jongwutiwes, S. (2010) Identification of a novel t17 genotype of acanthamoeba from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol* **48**: 4636-4640.
Nygard, K., Werner-Johansen, O., Ronsen, S., Caugant, D.A., Simonsen, O., Kanestrom, A., Ask, E., Ringstad, J., Odegard, R., Jensen, T., Krogh, T., Hoiby, E.A., Ragnhildstveit, E., Aaberge, I.S., and Aavitsland, P. (2008) An outbreak of legionnaires disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway. *Clin Infect Dis* **46**: 61-69.

O

O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.
Ogata, N. (2007) Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry* **46**: 4898-4911.
Ohno, A., Kato, N., Yamada, K., and Yamaguchi, K. (2003) Factors influencing survival of Legionella pneumophila serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2540-2547.

Ohno, A., Kato, N., Sakamoto, R., Kimura, S., and Yamaguchi, K. (2008) Temperature-dependent parasitic relationship between Legionella pneumophila and a free-living amoeba (Acanthamoeba castellanii). *Appl Environ Microbiol* **74**: 4585-4588.
Olert, J., Wiedorn, K.H., Goldmann, T., Kuhl, H., Mehraein, Y., Scherthan, H., Niketeghad, F., Vollmer, E., Muller, A.M., and Muller-Navia, J. (2001) HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* **197**: 823-826.
Opperdoes, F.R., De Jonckheere, J.F., and Tielens, A.G. (2011) Naegleria gruberi metabolism. *Int J Parasitol* **41**: 915-924.
Organization, W.H. (2007) Legionella and the prevention of legionellosis.
Orrison, L.H., Cherry, W.B., and Milan, D. (1981) Isolation of Legionella pneumophilia from cooling tower water by filtration. *Appl Environ Microbiol* **41**: 1202-1205.
Ortiz-Roque, C.M., and Hazen, T.C. (1987) Abundance and distribution of Legionellaceae in Puerto Rican waters. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2231-2236.
Ott, M., Messner, P., Heesemann, J., Marre, R., and Hacker, J. (1991) Temperature-dependent expression of flagella in Legionella. *J Gen Microbiol* **137**: 1955-1961.

P

Palero, F., Hall, H., Clarck, P., Johnson, D., Mackensie-dodds, J., and Thatje, S. (2010) DNA extraction from formalin-fixed tissue : new light from the deep sea. *Scienta marina* **74**: 465-470.
Palmer, C.J., Tsai, Y.L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C., and 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**: 3618-3624.
Parry, J.D. (2004) Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv Appl Microbiol* **54**: 167-196.
Payment, P., Berube, A., Perreault, D., Armon, R., and Trudel, M. (1989) Concentration of Giardia lamblia cysts, Legionella pneumophila, Clostridium perfringens, human enteric viruses, and coliphages from large volumes of drinking water, using a single filtration. *Can J Microbiol* **35**: 932-935.
Pernin, P., Pelandakis, M., Rouby, Y., Faure, A., and Siclet, F. (1998) Comparative recoveries of Naegleria fowleri amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol* **64**: 955-959.
Phe, M.H., Dossot, M., Guilloteau, H., and Block, J.C. (2005) Nucleic acid fluorochromes and flow cytometry prove useful in assessing the effect of chlorination on drinking water bacteria. *Water Res* **39**: 3618-3628.
Philippe, C., Blech, M.F., and Hartemann, P. (2006) [Intra-amoebal development of Legionella pneumophila and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaires' disease]. *Med Mal Infect* **36**: 196-200.
Pickup, Z.L., Pickup, R., and Parry, J.D. (2007a) Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae Acanthamoeba castellanii and Hartmannella vermiformis. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2631-2634.
Pickup, Z.L., Pickup, R., and Parry, J.D. (2007b) A comparison of the growth and starvation responses of Acanthamoeba castellanii and Hartmannella vermiformis in the presence of suspended and attached Escherichia coli K12. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 556-563.
Pine, L., George, J.R., Reeves, M.W., and Harrell, W.K. (1979) Development of a chemically defined liquid medium for growth of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* **9**: 615-626.
Pruckler, J.M., Benson, R.F., Moyenuddin, M., Martin, W.T., and Fields, B.S. (1995) Association of flagellum expression and intracellular growth of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **63**: 4928-4932.
Puchtler, H., and Meloan, S.N. (1985) On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* **82**: 201-204.
Puytorac, P.D., Grain, J., and Mignot, J.P. (1987) Précis de protistologie.

Q

Quach, N., Goodman, M.F., and Shibata, D. (2004) In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin Pathol* **4**: 1.

R

Rakic, A., Peric, J., and Foglar, L. (2012) Influence of temperature, chlorine residual and heavy metals on the presence of Legionella pneumophila in hot water distribution systems. *Ann Agric Environ Med* **19**: 431-436.

Reeves, M.W., Pine, L., Hutner, S.H., George, J.R., and Harrell, W.K. (1981) Metal requirements of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* **13**: 688-695.

Richards, A.M., Von Dwingelo, J.E., Price, C.T., and Abu Kwaik, Y. (2013) Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella-amoeba interaction. *Virulence* **4**: 307-314.

Riffard, S., Douglass, S., Brooks, T., Springthorpe, S., Filion, L.G., and Sattar, S.A. (2001) Occurrence of Legionella in groundwater: an ecological study. *Water Sci Technol* **43**: 99-102.

Riviere, D., Szczebara, F.M., Berjeaud, J.M., Frere, J., and Hechard, Y. (2006) Development of a real-time PCR assay for quantification of Acanthamoeba trophozoites and cysts. *J Microbiol Methods* **64**: 78-83.

Rodriguez-Zaragoza (1994) Ecology of free-living amoebae. *critical reviews in microbiology* **20**: 225-241.

Rodriguez, M.J., and Serodes, J.B. (2001) Spatial and temporal evolution of trihalomethanes in three water distribution systems. *Water Res* **35**: 1572-1586.

Rogers, B.B., Alpert, L.C., Hine, E.A., and Buffone, G.J. (1990) Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* **136**: 541-548.

Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F., and Wilhelm, M. (1998) Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1822-1824.

Rossier, O., Dao, J., and Cianciotto, N.P. (2009) A type II secreted RNase of Legionella pneumophila facilitates optimal intracellular infection of Hartmannella vermiformis. *Microbiology* **155**: 882-890.

Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179-1183.

Rowbotham, T.J. (1986) Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci* **22**: 678-689.

S

Sakamoto, R., Ohno, A., Nakahara, T., Satomura, K., Iwanaga, S., Kouyama, Y., Kura, F., Kato, N., Matsubayashi, K., Okumiya, K., and Yamaguchi, K. (2009) Legionella pneumophila in rainwater on roads. *Emerg Infect Dis* **15**: 1295-1297.

Sanli-Yurudu, N.O., Kimiran-Erdem, A., and 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**: 147-153.

Schoen, M.E., and Ashbolt, N.J. (2011) An in-premise model for Legionella exposure during showering events. *Water Res* **45**: 5826-5836.

Schroeder, G.N., Petty, N.K., Mousnier, A., Harding, C.R., Vogrin, A.J., Wee, B., Fry, N.K., Harrison, T.G., Newton, H.J., Thomson, N.R., Beatson, S.A., Dougan, G., Hartland, E.L., and Frankel, G. (2010) Legionella pneumophila strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol* **192**: 6001-6016.

Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., Fuerst, P.A., and Byers, T.J. (2001) Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* **39**: 1903-1911.

Schuster, F.L. (2002) Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* **15**: 342-354.
Schuster, F.L., and Visvesvara, G.S. (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* **34**: 1001-1027.
Shelton (1994) legionnaires' disease outbreaks and cooling towers with amplified Legionella concentrations *Current microbiology* **28**: 359-363.
Sherr, B.F., Sherr, E.B., and Berman, T. (1983) Grazing, growth, and ammonium excretion rates of a heterotrophic microflagellate fed with four species of bacteria. *Appl Environ Microbiol* **45**: 1196-1201.
Sherr, E.B., and Sherr, B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 293-308.
Skinner, A.R., Anand, C.M., Malic, A., and Kurtz, J.B. (1983) Acanthamoebae and environmental spread of Legionella pneumophila. *Lancet* **2**: 289-290.
Smirnov (1999) New data on the cyst structure of Hartmannella vermiformis Page, 1967. *Protistology* **1**: 82-85.
Smith, L., Carroll, K., and Mottice, S. (1993) Comparison of membrane filters for recovery of legionellae from water samples. *Appl Environ Microbiol* **59**: 344-346.
Srikanth, S., and Berk, S.G. (1993) Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3245-3249.
Srinivasan, A., Bova, G., Ross, T., Mackie, K., Paquette, N., Merz, W., and Perl, T.M. (2003) A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control Legionella species in a hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol* **24**: 575-579.
States, S.J., Conley, L.F., Ceraso, M., Stephenson, T.E., Wolford, R.S., Wadowsky, R.M., McNamara, A.M., and Yee, R.B. (1985) Effects of metals on Legionella pneumophila growth in drinking water plumbing systems. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1149-1154.
Steele, T.W., Lanser, J., and Sangster, N. (1990) Isolation of Legionella longbeachae serogroup 1 from potting mixes. *Appl Environ Microbiol* **56**: 49-53.
Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., and Quinn, F. (1998) Mycobacterium avium bacilli grow saprozoically in coculture with Acanthamoeba polyphaga and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2256-2261.
Steinert, M., Hentschel, U., and Hacker, J. (2002) Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 149-162.
Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., and Glockner, G. (2007) Legionella pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol* **297**: 577-587.
Stewart, J.R., and Weisman, R.A. (1972) Exocytosis of latex beads during the encystment of Acanthamoeba. *J Cell Biol* **52**: 117-130.
Stockman, L.J., Wright, C.J., Visvesvara, G.S., Fields, B.S., and Beach, M.J. (2010) Prevalence of Acanthamoeba spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA-1990-1992. *Parasitol Res*.
Stone, B.J., and Abu Kwaik, Y. (1998) Expression of multiple pili by Legionella pneumophila: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **66**: 1768-1775.
Storey, M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J., and Stenstrom, T.A. (2004) The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. *Scand J Infect Dis* **36**: 656-662.
Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A., and Byers, T.J. (1998) The evolutionary history of the genus Acanthamoeba and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* **45**: 45-54.
Stout, J.E., Yu, V.L., and Best, M.G. (1985) Ecology of Legionella pneumophila within water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **49**: 221-228.
Sutherland, I. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**: 3-9.

Swango, L.J., Wilt, G.R., Killen, A.D., Williams, D.E., and Worley, S.D. (1987) Inactivation of Legionella pneumophila by hypochlorite and an organic chloramine. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2983-2986.
Swanson, M.S., and Isberg, R.R. (1995) Association of Legionella pneumophila with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* **63**: 3609-3620.
Swanson, M.S., and Hammer, B.K. (2000) Legionella pneumophila pathogesesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* **54**: 567-613.

T

Tatlock, H. (1947) Studies on a Virus from a Patient with Fort Bragg Fever (Pretibial Fever). *J Clin Invest* **26**: 287-297.
Taylor, M., Ross, K., and Bentham, R. (2009) Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* **58**: 538-547.
Taylor, M., Ross, K., and Bentham, R. (2013) Spatial arrangement of *Legionella* colonies in intact biofilms from a model cooling water system. *microbiology insights* **6**: 49-57.
Temmerman, R., Vervaeren, H., Noseda, B., Boon, N., and Verstraete, W. (2006) Necrotrophic growth of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4323-4328.
Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., and Levi, Y. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. *J Appl Microbiol* **97**: 950-963.
Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., and Greub, G. (2006) Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2428-2438.
Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., and Maillard, J.Y. (2009) Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev*.
Thomas, W.M., Eccles, J., and Fricker, C. (1999) Laboratory Observations of Biocide Efficiency against Legionella in Model Cooling Tower Systems. *ASHRAE research projet 954-RP*.
Tyndall, R.L., and Domingue, E.L. (1982) Cocultivation of Legionella pneumophila and free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* **44**: 954-959.
Tyson, J.Y., Pearce, M.M., Vargas, P., Bagchi, S., Mulhern, B.J., and Cianciotto, N.P. (2013) Multiple Legionella pneumophila Type II secretion substrates, including a novel protein, contribute to differential infection of the amoebae Acanthamoeba castellanii, Hartmannella vermiformis, and Naegleria lovaniensis. *Infect Immun* **81**: 1399-1410.

U

Unger, C., and Luck, C. (2012) Inhibitory effects of silver ions on Legionella pneumophila grown on agar, intracellular in Acanthamoeba castellanii and in artificial biofilms. *J Appl Microbiol* **112**: 1212-1219.

V

Valster, R.M., Wullings, B.A., and van der Kooij, D. (2010) Detection of protozoan hosts for Legionella pneumophila in engineered water systems by using a biofilm batch test. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7144-7153.
Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S., and Abu Kwaik, Y. (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan Hartmannella vermiformis as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J Exp Med* **186**: 537-547.
Venkataraman, C., Gao, L.Y., Bondada, S., and Kwaik, Y.A. (1998) Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host Hartmannella vermiformis as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, Legionella pneumophila. *J Exp Med* **188**: 505-514.
Verdon, J., Labanowski, J., Sahr, T., Ferreira, T., Lacombe, C., Buchrieser, C., Berjeaud, J.M., and Hechard, Y. (2011) Fatty acid composition modulates sensitivity of Legionella pneumophila to warnericin RK, an antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 1146-1153.

Visvesvara, G.S., Moura, H., and Schuster, F.L. (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**: 1-26.
Visvesvara, G.S., and Schuster, F.L. (2008a) Opportunistic Free-Living Amebae, Part II. *Clinical microbiology newsletter* **30**: 159-166.
Visvesvara, G.S., and Schuster, F.L. (2008b) Opportunistic Free-living Amebae, Part I. *clinical microbiology newsletter* **30**: 152-158.

W

Wadowsky, R.M., Wilson, T.M., Kapp, N.J., West, A.J., Kuchta, J.M., States, S.J., Dowling, J.N., and Yee, R.B. (1991) Multiplication of Legionella spp. in tap water containing Hartmannella vermiformis. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1950-1955.
Walker, J.T., Mackerness, C.W., Mallon, D., Makin, T., Williets, T., and Keevil, C.W. (1995) Control of Legionella pneumophila in a hospital water system by chlorine dioxide. *J Ind Microbiol* **15**: 384-390.
Walochnik, J., Wylezich, C., and Michel, R. (2009) The genus Sappinia: history, phylogeny and medical relevance. *Exp Parasitol* **126**: 4-13.
Wang, H., Masters, S., Hong, Y., Stallings, J., Falkinham, J.O., 3rd, Edwards, M.A., and Pruden, A. (2012) Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of Legionella, mycobacteria, Pseudomonas aeruginosa, and two amoebas. *Environ Sci Technol* **46**: 11566-11574.
Watters, S.K., Pyle, B.H., LeChevallier, M.W., and McFeters, G.A. (1989) Enumeration of Enterobacter cloacae after chloramine exposure. *Appl Environ Microbiol* **55**: 3226-3228.
Weekers, P.H., Bodelier, P.L., Wijen, J.P., and Vogels, G.D. (1993) Effects of Grazing by the Free-Living Soil Amoebae Acanthamoeba castellanii, Acanthamoeba polyphaga, and Hartmannella vermiformis on Various Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2317-2319.
Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E., Dasch, G.A., Mallavia, L.P., Baca, O., Mandelco, L., Sechrest, J.E., Weiss, E., and Woese, C.R. (1989) Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol* **171**: 4202-4206.
Wery, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgenes, J.P., Garrelly, L., and Godon, J.J. (2008) Dynamics of Legionella spp. and bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a cooling tower facility. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3030-3037.
Whiley, H., and Bentham, R. (2011) Legionella longbeachae and legionellosis. *Emerg Infect Dis* **17**: 579-583.
Whiley, H., Taylor, M., and Bentham, R. (2011) Detection of Legionella species in potting mixes using fluorescent in situ hybridisation (FISH). *J Microbiol Methods*.
Williams, M.M., and Braun-Howland, E.B. (2003) Growth of Escherichia coli in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5463-5471.
Wingender, J., and Flemming, H.C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health*.
Wolfe, R.L., Ward, N.R., and Olson, B.H. (1984) Inorganic chloramines as drinking water disinfectants : a review. *Research and technology*.
Wright, J.B., Ruseska, I., and Costerton, J.W. (1991) Decreased biocide susceptibility of adherent Legionella pneumophila. *J Appl Bacteriol* **71**: 531-538.

X

Xu, L., and Luo, Z.Q. (2012) Cell biology of infection by Legionella pneumophila. *Microbes Infect* **15**: 157-167.

Y

Yamamoto, H., Sugiura, M., Kusunoki, S., Ezaki, T., Ikedo, M., and Yabuuchi, E. (1992) Factors Stimulating Propagation of Legionellae in Cooling Tower Water. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1394-1397.

Yanez, M.A., Carrasco-Serrano, C., Barbera, V.M., and Catalan, V. (2005) Quantitative detection of Legionella pneumophila in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3433-3441.

Yanez, M.A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Murtula, R., Martinez, L., and Catalan, V. (2011) Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J Microbiol Methods* **85**: 124-130.

Yaradou, D.F., Hallier-Soulier, S., Moreau, S., Poty, F., Hillion, Y., Reyrolle, M., Andre, J., Festoc, G., Delabre, K., Vandenesch, F., Etienne, J., and Jarraud, S. (2007) Integrated real-time PCR for detection and monitoring of Legionella pneumophila in water systems. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1452-1456.

Yu, V.L. (1993) Could aspiration be the major mode of transmission for Legionella? *Am J Med* **95**: 13-15.

Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L., and Chereshsky, A. (2002) Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* **186**: 127-128.

ANNEXES

ANNEXE 1: SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES EN SEQUENÇAGE, PCRQ ET FISH

Nom de l'amorce	Utilisation	Référence	Séquence (sens 5'-3')
Mip A1	PCRq légionelles	(Joly *et al.*, 2006)	A GCA TTG GTG CCG ATT TGG
Mip A2			A G[CT]T TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA
Amo 1400F	PCRq amibes	(Le Calvez *et al.*, 2012)	ATG CCG ACC ARS GAT YMG GAG
Amo 1540R			CAA GST GCY MGG GGA GTC AT
Vahl 560F			AGG TAG TGA CAA GMY RTA GYG ACT
Vahl 730R			GGG CGT TTT AAC TAC ARC AGT ATT A
EUB 338	FISH bactéries totales	(Amann *et al.*, 1990)	GCT GCC TCC CGT AGG AGT
LEG705	FISH légionelles	(Manz *et al.*, 1995)	CTG GTG TTC CTT CCG ATC
LEGPNE1		(Grimm *et al.*, 1998)	ATC TGA CCG TCC CAG GTT
Ami6 F1	Séquençage amibes	(Thomas *et al.*, 2006)	CCA-GCT-CCA-ATA-GCG-TAT-ATT
Ami9 R			GTT-GAG-TCG-AAT-TAA-GCC-GC

ANNEXE 2: SOLUTIONS UTILISEES POUR LA METHODE FISH

PFA 3X :

45 mL d'eau ultrapure sont chauffés à 60°C puis 1,5 g de PFA sont introduits. Quelques gouttes de NaOH à 10 M sont ajoutées, sous agitation, pour dissoudre le PFA puis 5 mL de PBS 10X sont rajoutés. La solution est refroidie sur glace, le pH est ensuite ajusté précisément entre 7,2 et 7,4 à l'aide de HCl concentré. La solution est filtrée sur une membrane hydrophile de porosité 0,22 µm et aliquotée pour être stockée à -20°C pendant 15 jours. La solution ne peut être stockée plus longtemps car le formol se décompose en acide formique qui détruit les échantillons.

NaCl 5M :

Composition pour 200 mL :

- NaCl 58,4 g

Le volume est ajusté à 200 mL avec l'eau EUP, et la solution est stérilisée par autoclavage.

Tris HCl 1 M pH 8 :

Composition pour 200 mL :

- Tris base 24,23 g

100 ml d'eau EUP sont ajoutés, le pH est ajusté à 8 à l'aide d'HCl concentré, le volume est ensuite complété à 200 mL et la solution est stérilisée par autoclavage.

EDTA 0,5 M pH 8 :

Composition pour 200 mL :

- EDTA : 37,22 g

Le volume est complété à 200 mL avec de l'eau EUP, et 4 g de NaOH à chaud sont ajoutés, le pH est ajusté à 8 pastille par pastille. La solution est stérilisée par autoclavage.

SDS 10 % :

Composition pour 100 mL :

- SDS : 10 g

Le volume est complété à 100 mL avec de l'eau EUP. La solution n'est pas autoclavée.

PBS (0,13 M NaCl, 7mM Na_2HPO_4, 3mM NaH_2PO4) pH 7,2 dans l'eau :

Composition pour une solution 10 X :

- NaCl : 15,2 g
- Na_2HPO_4 : 2 g
- NaH_2PO_4 : 0,94 g

Le volume est complété à 200 mL avec de l'eau EUP, le pH ajustée 7,2 avec du NaOH et la solution est stérilisée par autoclavage.

ANNEXE 3: SOLUTIONS UTILISEES POUR L'IMMUNO-CAPTURE

<u>Solution B :</u> tampon Na-Phosphate 0,1M pH 7,4

Composition pour 1 L :

- NaH_2PO_4 2,27 g
- Na_2HPO_4 14,42 g

Le pH est ajusté à 7,4 et le volume de la solution complétée à 1 Litre avec de l'eau milliRO

<u>Solution C :</u> tampon 3M de sulfate d'ammonium dans le tampon B

Composition pour 100 mL :

- $(NH_4)_2SO_4$ dans du tampon B 39,64g

Le pH est ajusté avec NaOH ou HCL à 7,4 et le volume complété à 100 mL avec de l'eau milliRO

<u>Solution D :</u> tampon PBS pH 7,4 avec 0,5%(w/v) BSA

Composition pour 100 mL :

- NaCl (MW: 58,4g) 0,88g
- 0,5% BSA (w/v)
- 0,01M de tampon Na-Phosphate pH 7,4 80 mL

La solution est mélangée vigoureusement et le volume est porté à 100 mL avec 0,01M de tampon Na-phosphate pH 7,4

<u>Solution E :</u> tampon PBS pH 7,4 avec 0,1%(w/v) BSA

Composition pour 100 mL :

- NaCl (MW: 58,4g) 0,88g
- 0,1% BSA (w/v)
- 0,01M de tampon Na-Phosphate pH 7,4 80 mL

La solution est mélangée vigoureusement et le volume est porté à 100 mL avec 0,01M de tampon Na-phosphate pH 7,4

ANNEXE 4: TABLEAU NNP 3 :

DENOMBREMENT PAR METHODE NPP

Volume inoculum (µL)			NPP/mL	Limites (intervalle de confiance 95%)		Volume inoculum (µL)			NPP/mL	Limites (intervalle de confiance 95%)	
100	10	1		Basse	Haute	100	10	1		Basse	Haute
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	

ANNEXE 5: EFFICIENCY OF WATER DISINFECTANTS AGAINST *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* AND *ACANTHAMOEBA*

Mathieu Dupuy, Stéphane Mazoua, Florence Berne, Charles Bodet, Nathalie Garrec, Pascaline Herbelin, Florence Ménard-Szczebara, Sandrine Oberti, Marie-Hélène Rodier, Sylvie Soreau, France Wallet, Yann Héchard

Water research 45 (2011) 1087-1094

water research 45 (2011) 1087e1094

Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Efficiency of water disinfectants against Legionella pneumophila and Acanthamoeba

Mathieu Dupuy [a], Stéphane Mazoua [a], Florence Berne [a], Charles Bodet [a], Nathalie Garrec [b], Pascaline Herbelin [c], Florence Ménard-Szczebara [d], Sandrine Oberti [d], Marie-Hélène Rodier [a], Sylvie Soreau [c], France Wallet [e], Yann Héchard [a,*]

[a] Université de Poitiers, Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau, CNRS UMR 6008, 40 avenue du recteur Pineau, 86022 Poitiers Cedex, France
[b] CAE, Veolia Environnement, 1 place de Turenne, 94410 Saint-Maurice Cedex, France
[c] EDF, Division Recherche et Développement, 6 Quai Watier, 78401 Chatou, France
[d] Anjou Recherche, Veolia Environnement, Chemin de la digue BP76, 78603 Maisons Laffitte Cedex, France
[e] EDF, Service des Etudes Médicales, 22-28 rue Joubert, 75009 Paris, France

article info

Article history:
Received 8 June 2010
Received in revised form
18 October 2010
Accepted 19 October 2010
Available online 28 October 2010

Keywords:
Chlorine
Amoebae
Bacteria
Oxidant
Biocide

abstract

Free-living amoebae might be pathogenic by themselves and be a reservoir for bacterial pathogens, such as Legionella pneumophila. Not only could amoebae protect intra-cellular Legionella but Legionella grown within amoebae could undergo physiological modifications and become more resistant and more virulent. Therefore, it is important to study the efficiency of treatments on amoebae and Legionella grown within these amoebae to improve their application and to limit their impact on the environment.

With this aim, we compared various water disinfectants against trophozoites of three Acanthamoeba strains and L. pneumophila alone or in co-culture. Three oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and chorine dioxide) were assessed. All the samples were treated with disinfectants for 1 h and the disinfectant concentration was followed to calculate disinfectant exposure (Ct). We noticed that there were significant differences of susceptibility among the Acanthamoeba strains. However no difference was observed between infected and non-infected amoebae. Also, the comparison between the three disinfectants indicates that monochloramine was efficient at the same level towards free or co-cultured L. pneumophila while chlorine and chlorine dioxide were less efficient on co-cultured L. pneumophila. It suggests that these disinfectants should have different modes of action. Finally, our results provide for the first time disinfectant exposure values for Acanthamoeba treatments that might be used as references for disinfection of water systems.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Legionella pneumophila is a waterborne pathogenic bacterium responsible for severe pneumonia called Legionnaires' disease (Fields et al., 2002; Steinert et al., 2002). L. pneumophila can be found at high levels in man-made water systems such as air conditioning, cooling towers and spas (Borella et al., 2005). These systems are mainly implicated in outbreaks as they

* Corresponding author. Tel.: þ33 5 49 45 40 07; fax: þ33 5 49 45 35 03.
E-mail address: yann.hechard@univ-poitiers.fr (Y. Héchard).
0043-1354/$ e see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.watres.2010.10.025

might produce infected water droplets, which are inhaled by people. In the environment, L. pneumophila is ubiquitously found in fresh water and could survive within biofilms and free-living amoebae (Borella et al., 2005; Taylor et al., 2009; Temmerman et al., 2006). Several protozoa, such as free-living amoebae, feed on biofilms leading to L. pneumophila phagocytosis. However, L. pneumophila has the ability to resist phagocytosis and multiply within amoebae, via a well-known mechanism (Molmeret et al., 2004). A similar mechanism is used by these bacteria to resist phagocytosis by macrophages, leading to lung infection (Molmeret et al., 2004). Protozoa, such as amoebae, are proposed to provide an intra-cellular environment for L. pneumophila multiplication in water systems. It may also be expected that bacteria will multiply freely under specific conditions (Borella et al., 2005; Taylor et al., 2009). In the amoebae, intra-cellular Legionella are i) protected from adverse conditions or disinfectant treatments (Bichai et al., 2008; Thomas et al., 2004), ii) highly virulent as they adapt to intra-cellular life (Molmeret et al., 2005) and iii) less sensitive to disinfectants because of phenotypic modification (Garduno et al., 2002). Various disinfectants (e.g. chlorine, monochloramine, ..) and physical treatments (e.g. heat, UV, ..) are used in water systems to control Legionella growth (Kim et al., 2002). Several disinfection studies have been performed on Legionella (Campos et al., 2003; Kim et al., 2002). In case of treatment failure, L. pneumophila might be able to recolonize water systems. It has been hypothesized that this recolonization is made possible because Legionella is protected in the biofilm or in amoebae (Barker et al., 1992; Donlan et al., 2005; Murga et al., 2001). Few studies have examined the impact of these treatments on L. pneumophila grown in co-culture with amoebae (Garcia et al., 2007; Storey et al., 2004). In addition, only few studies have reported the impact of chlorine on Acanthamoeba (Critchley and Bentham, 2009; Cursons et al., 1980; Kuchta et al., 1993) but no Ct values were calculated and monochloramine was poorly studied.

In our study, we compared the efficiency of three disinfectants, commonly used in water treatments, on three strains of Acanthamoeba and one strain of L. pneumophila alone or in co-culture.

2. Materials and methods

2.1. Amoebae isolation and culture

With the aim to isolate environmental strains, water samples from different sources were collected by Anjou Recherche (Maisons-Laffitte, France) and Electricité De France (EDF Chatou, France). A drop of water was placed onto a non-nutrient agar plate (made only with water and agar 15 g/L) seeded with a lawn of Escherichia coli XL1 Blue (Stratagene). This medium is referred to as NNA-Eco. Plates were incubated at various temperatures and examined daily for 7e14 days. After amoebae growth (indicated by zone of lysis), an isolate was transferred onto a fresh NNA-Eco plate.

The amoebae grown on NNA-Eco were then transferred to axenic broth 1034 medium (peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L, ribonucleic acid 1 g/L, folic acid 115 mg/L, hemin 1 mg/L, KH_2PO_4 0.36 g/L, Na_2HPO_4 0.5 g/L, pH 6.5) containing antibiotics (ampicillin 200 mg/mL and streptomycin 200 mg/mL). All isolates adapted to growth in axenic medium were sub-cultured in the 1034 medium without antibiotic at 25 C.

2.2. L. pneumophila culture

L. pneumophila Lens was kindly provided by the National Reference Center of Legionella, Lyon, France (Cazalet et al., 2004). The bacteria were grown on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plates at 37 C for 4 days before co-culture experiments.

2.3. Co-culture of L. pneumophila and Acanthamoeba

Axenic Acanthamoeba were grown at 25 C for 3 days in 25-cm^2 tissue culture flasks (NUNC) containing 5 mL of 1034 medium. Adherent trophozoites were washed once with amoeba buffer (2.5 mM KH_2PO_4, 4 mM $MgSO_4$, 0.5 mM $CaCl_2$, 2.5 mM, Na_2HPO_4, 0.05 mM $(NH_4)_2Fe^{II}(SO_4)_2$) and suspended in this buffer. The cells were then pelleted by centrifugation (500g, 15 min) and resuspended at a concentration of 10^6 cells/mL in amoeba buffer supplemented with 10% 1034 medium.

L. pneumophila Lens were harvested from BCYE plate and diluted in amoeba buffer at a concentration of 10^8 cells/mL. An aliquot of this sample was added to the trophozoites' suspension to achieve a multiplicity of infection (MOI) of 0.1, leading to a final concentration of amoebae and L. pneumophila Lens of 10^5e10^6 cells/mL and 10^4e10^5 cells/mL, respectively. All the samples were incubated at 30 C for 24e48 h. Co-cultures contained both infected and non-infected trophozoites, as well as free L. pneumophila. The samples were centrifuged (500g, 15 min), washed twice in phosphate buffer (50 mM, pH 8) and adjusted to 10^6 amoebae/mL before disinfection treatments.

2.4. Amoeba identification

DNA was extracted from amoeba cells using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey Nagel). An 18S rDNA PCR was performed with primers Ami6F1 and Ami9R, as described previously (Thomas et al., 2006). The amplicons (w850 bp) were sequenced with each primer using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed using the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.5. Disinfection treatments

Three different disinfectants, commonly used by industries to disinfect their networks and circuits, were used: chlorine at 30 C (used in cooling towers) or at 50 C (used in hot water systems), chlorine dioxide and monochloramine. The initial concentrations were as follows: chlorine between 2 and 3 mg Cl_2/L (to provide approximately 1 mg Cl_2/L residual after 1 h), chlorine dioxide 0.4 mg/L and monochloramine 0.8 mg Cl_2/L. All the solutions were prepared from reagent-grade chemicals and deionized water. Stock solutions were stored at 4 C. All the glassware was cleaned with chlorine (100 mg/L) for at least 1 h and carefully rinsed with deionized water. Chlorine solution was freshly prepared by dilution of sodium hypochlorite (13%, ACROS Organics). Chlorine

concentration was measured by the 4500-Cl G DPD method (APHA, 2005) before and during treatments in order to determine the residual concentration. Stock solution of monochloramine was obtained by adding free chlorine in a solution of ammonium chloride under agitation, with a chlorine to nitrogen molar ratio of 0.5 and at a pH of 8.5. The final concentration of the stock solution of monochloramine was 2 mM (or about 140 mg Cl_2/L). A stock solution of chlorine dioxide was prepared by slowly adding sulfuric acid to a sodium chlorite solution and then by collecting the gaseous chlorine dioxide produced in ultrapure water according to the 4500-ClO_2 B method (APHA, 2005). The concentration of the stock solution was about 400 mg/L. The DPD method was also used to measure the residual concentration of monochloramine and chlorine dioxide. Treatment with chlorine, monochloramine and chlorine dioxide was stopped by addition of 10 mL of sterile sodium thiosulfate (0.1 M).

Before each treatment, 1 mL of microbial cells' suspension was transferred into 100 mL of sterile phosphate buffer (50 mM, pH 8), leading to a concentration of 10^4 amoebae/mL and 10^4e10^5 L. pneumophila/mL. The sample was incubated at 30 C (and 50 C for chlorine only) under agitation and disinfectant (between 0.1 and 0.5 mL at room temperature) was added. The concentration of disinfectant (Supplementary figures) and the survival of Acanthamoeba and L. pneumophila were followed after 0, 2, 15, 30 and 60 min of treatment. For each experiment, a disinfectant consumption test without microorganism was conducted in 100 mL of phosphate buffer under the same conditions of temperature in order to evaluate the stability of the biocide.

The disinfectant exposure was quantified by Ct (concentration time, in mg min/L), which corresponds to the geometric area under the disinfectant decay curve. Microbial inactivation (loss of cultivability) was recorded as a function of Ct, to evaluate the effectiveness of the disinfectants. Ct tables have been developed for some waterborne pathogens to indicate conditions necessary for a 2-log ($Ct_{99\%}$) or 3-log ($Ct_{99.9\%}$) inactivation (King et al., 1988; Rose et al., 2005). We have considered that treatments were efficient when a 3-log reduction was reached, as this value is mainly used in the literature.

2.6. Survival of Acanthamoeba and L. pneumophila

The survival of Acanthamoeba and L. pneumophila was determined by the most probable number (MPN) procedure (Beattie et al., 2003). For L. pneumophila counts, co-cultures were centrifuged (14,000g, 5 min) and vortexed for 1 min to release intra-trophozoite bacteria, as previously described (Wintermeyer et al., 1995). Then, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 mL of each sample was inoculated onto NNA-Eco plates for amoebae or onto BCYE plates for L. pneumophila. Each inoculation was done in quintuplicates. Plates were incubated for 15 days at 25 C for amoeba or 7 days at 37 C for L. pneumophila. Each plate was examined for the absence or presence of microbial growth and the results were reported using an MPN table (Beattie et al., 2003). The limits of detection were 1.8 10^2 NPP/
L and 1.6 10^6 NPP/L, leading to a maximum amplitude of 3.94 log.

3. Results

3.1. Isolation and identification of Acanthamoeba strains

Water samples from cooling towers were used to isolate amoebae on plates. Among the primary isolates, several amoebae, whose morphology was similar to that of Acanthamoeba strains, were selected.

Three of these strains were axenized in the 1034 medium. In order to confirm the genus of these amoebae at the molecular level, their 18S rDNA was sequenced. The comparison of these sequences to data banks (BLAST nr) unambiguously confirmed that they belong to the Acanthamoeba genus. Moreover, these strains were different from each other since their sequences displayed differences. These sequences were deposited at GenBank (GU936482, GU936483, GU936484). The strains were named Acanthamoeba V1, S2 and M3 respectively.

3.2. Acanthamoeba infection by L. pneumophila

The ability of L. pneumophila to infect each amoeba strain was tested. Amoebae (10^5 cells/mL) were mixed with L. pneumophila (10^4 cells/mL) to have a MOI of 0.1. The growth of L. pneumophila was followed by CFU measurement each day.

In co-culture with Acanthamoeba V1 or Acanthamoeba M3, L. pneumophila grew rapidly and at the same rate than in ATCC collection strains (Fig. 1). The population was amplified by more than 2 log within 48 h. Legionella grew slower, ending to 2-log amplification in 72 h with Acanthamoeba S2. These results show that Legionella was able to infect all these strains, although the infection rate might be different between the Acanthamoeba strains.

3.3. Chlorine treatment at 30 C and 50 C

The aim of this study was to compare disinfection treatments against L. pneumophila and Acanthamoeba, either alone or in

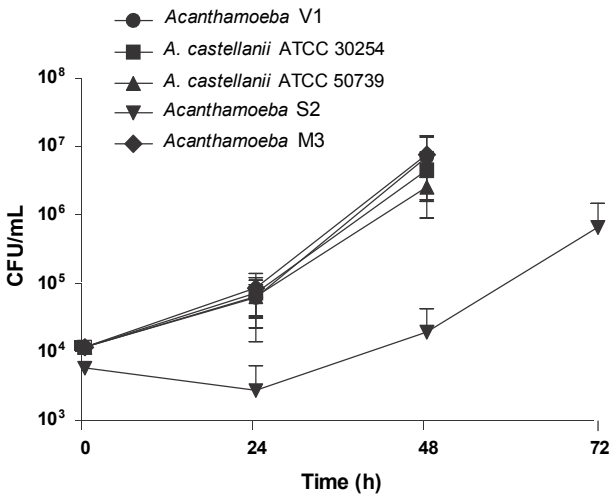


Fig. 1 e L. pneumophila growth in co-culture with various Acanthamoeba strains.

co-culture. The first step was to assess chlorine efficiency on these microorganisms at 30 C and 50 C. Cultures or co- cultures were treated with an initial chlorine concentration (between 2 and 3 Cl_2/L) chosen to have a residual free chlorine concentration of approximately 1 mg Cl_2/L at the end of the treatment. The consumption of biocides during the experi- ments was followed in order to calculate the Ct and is pre- sented in Figs. S1 and S2 (Supplementary information). The consumption of chlorine was lower with Legionella than with Acanthamoeba (Fig. S2).

The results with Acanthamoeba trophozoites show that chlorine was efficient to inactivate, by 3 log at least, all the strains (Fig. 2). The efficiency seems to be slightly higher at 50 C than at 30 C (Fig. 2). Inactivation values for Acanthamoeba are compared in Fig. 6. Statistical analyses (performed using unpaired two-tailed Student's t-test) show that, for a given Ct, there were significant differences of sensitivity between strains and that Acanthamoeba M3 was the more sensitive strain

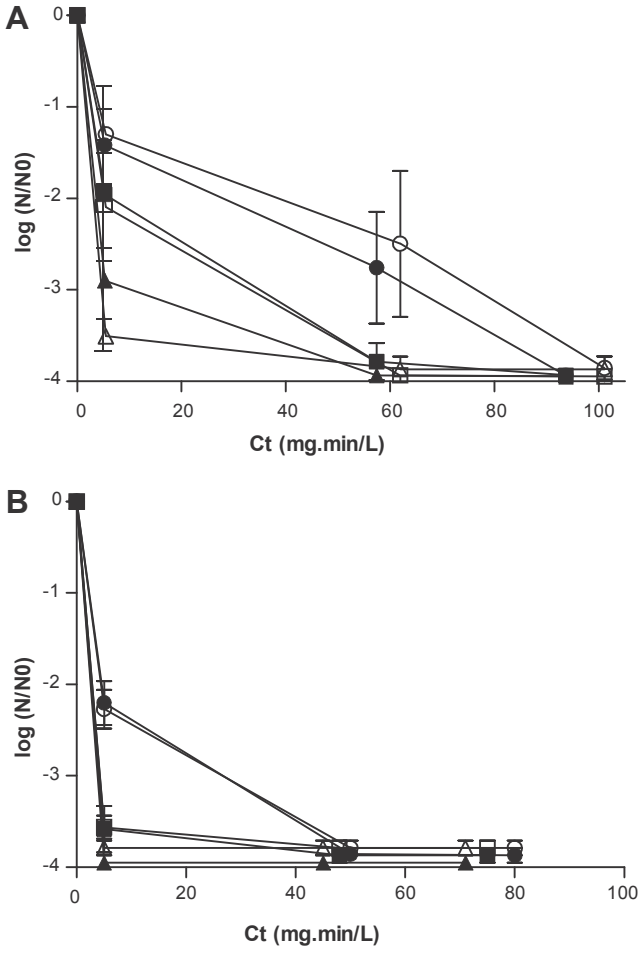


Fig. 2 e Reduction of Acanthamoeba trophozoites cultivability after chlorine treatment at 30 C (A) or 50 C (B). Acanthamoeba V1 infected (B) or not (C) with L. pneumophila, Acanthamoeba S2 infected (-) or not (—) with L. pneumophila, Acanthamoeba M3 infected (6) or not (:) with L. pneumophila was treated with the disinfectant for 60 min and the survival was counted by the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

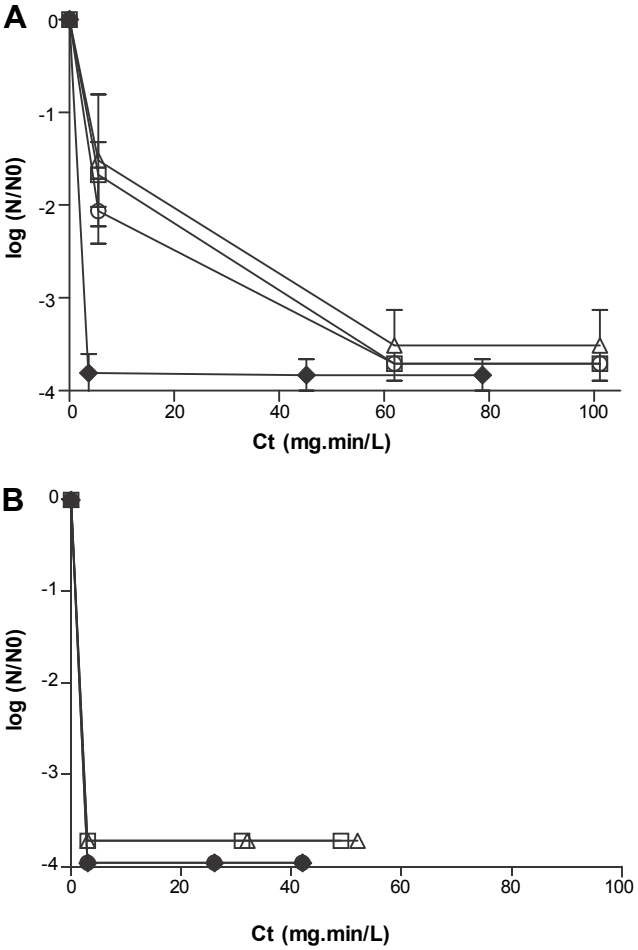


Fig. 3 e Reduction of L. pneumophila cultivability after chlorine treatment at 30 C (A) or 50 C (B). L. pneumophila alone (A) or in co-culture with Acanthamoeba V1 (B), Acanthamoeba S2 (-), or Acanthamoeba M3 (6) was treated with the disinfectant for 60 min and the survival was counted by the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

(Fig. 6A and B). Besides, there was no significant difference ($P > 0.005$) of sensitivity between infected or non-infected Acanthamoeba.

Chlorine treatment was also highly efficient on Legionella and treatment at 50 C seems to be even more efficient (Fig. 3). Inactivation values for Legionella are compared in Fig. 7. The comparison of inactivation at 30 C clearly shows that co-cultured L. pneumophila were significantly less sensitive ($P < 0.005$ or $P < 0.001$) than free L. pneumophila (Fig. 7A). This was not seen at 50 C (Fig. 7B) because the detection threshold was rapidly reached. Also, there was no difference ($P > 0.005$) between L. pneumophila co-cultivated with the different amoebae strains.

3.4. Monochloramine and chlorine dioxide treatment

Monochloramine (NH_2Cl, 0.8 mg Cl_2/L initial concentration) and chlorine dioxide (ClO_2, 0.4 mg/L initial concentration)

were used for amoeba and L. pneumophila treatment. The consumption of biocides during the experiments was followed in order to calculate the Ct and is presented in Figs. S3 and S4 (Supplementary information). Monochloramine concentration was more stable than those of chlorine or chlorine dioxide.

Chlorine dioxide was highly efficient on Acanthamoeba M3 only (Figs. 4B and 6C). Chlorine dioxide displayed an inactivation pattern similar to that of chlorine. Monochloramine was highly efficient on Acanthamoeba M3 and V1 but Acanthamoeba S2 was significantly less sensitive (Figs. 4A and 6D). As for chlorine, there was no significant difference ($P > 0.005$ using unpaired two-tailed Student's t-test) of sensitivity between infected and non-infected amoebae towards these two disinfectants (Fig. 6).

The results with L. pneumophila show that monochloramine and chlorine dioxide were efficient (Fig. 5). With chlorine dioxide, co-cultured bacteria were less sensitive ($P < 0.001$) than free bacteria (Fig. 7C). On the contrary, there was no significant difference ($P > 0.005$) between free and co-cultured bacteria treated with monochloramine (Fig. 7D).

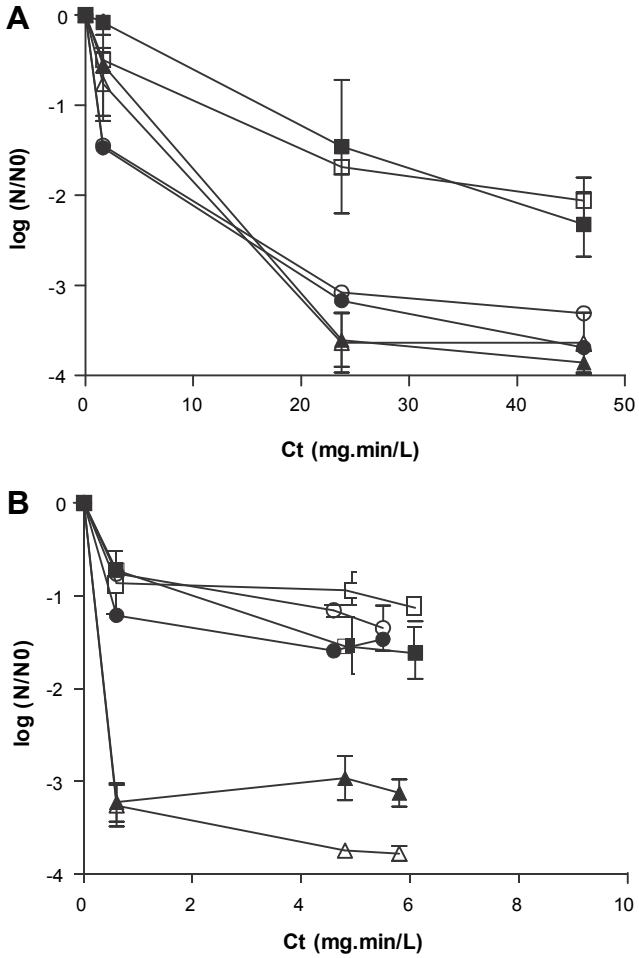


Fig. 4 – Reduction of Acanthamoeba trophozoites cultivability after monochloramine (A) or chlorine dioxide (B) treatments. Acanthamoeba V1 infected (■) or not (□) with L. pneumophila, Acanthamoeba S2 infected (●) or not (○) with L. pneumophila, Acanthamoeba M3 infected (▲) or not (△) with L. pneumophila was treated with the disinfectant for 60 min and the survival was counted by the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

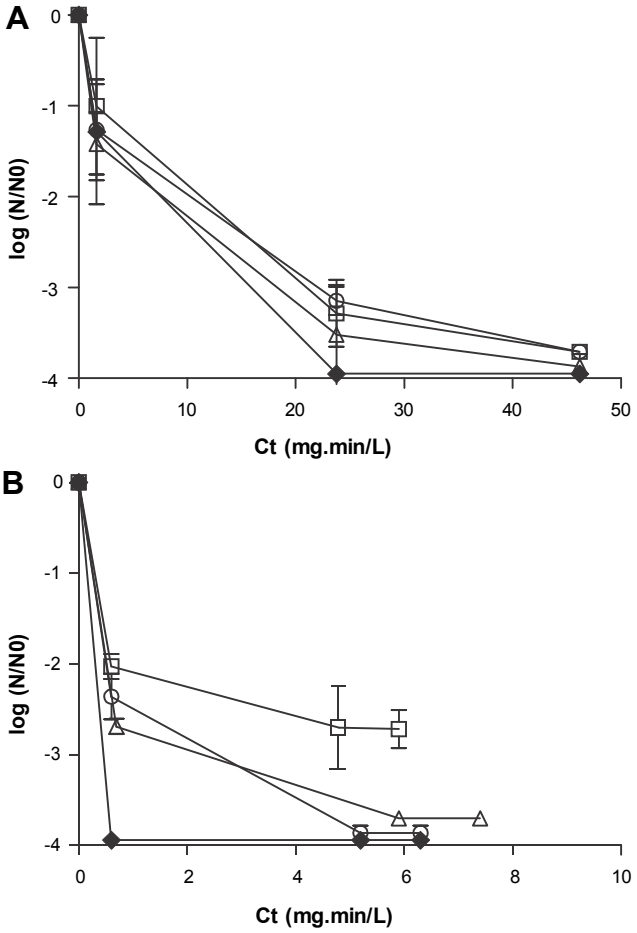


Fig. 5 – Reduction of L. pneumophila cultivability after monochloramine (A) or chlorine dioxide (B) treatments. L. pneumophila alone (■) or in co-culture with Acanthamoeba V1 (■), Acanthamoeba S2 (●), or Acanthamoeba M3 (▲) was treated with the disinfectant for 60 min and the survival was counted by the MPN method. Bars represent standards errors of the means of three independent experiments.

4. Discussion

In order to improve the efficiency of water treatment, we compared three disinfectants in controlled conditions. The treatment doses were chosen to be realistic and representative of actual practices. The results allow estimating both efficiency of the disinfectants and sensitivity of three Acanthamoeba strains and L. pneumophila alone or in co-culture. No study had compared the sensitivity of Acanthamoeba towards these three common disinfectants. Also, for water treatment, it is important to define Ct values to inactivate a given microorganism. We thus decided to calculate these Ct values and represent them in the function of inactivation.

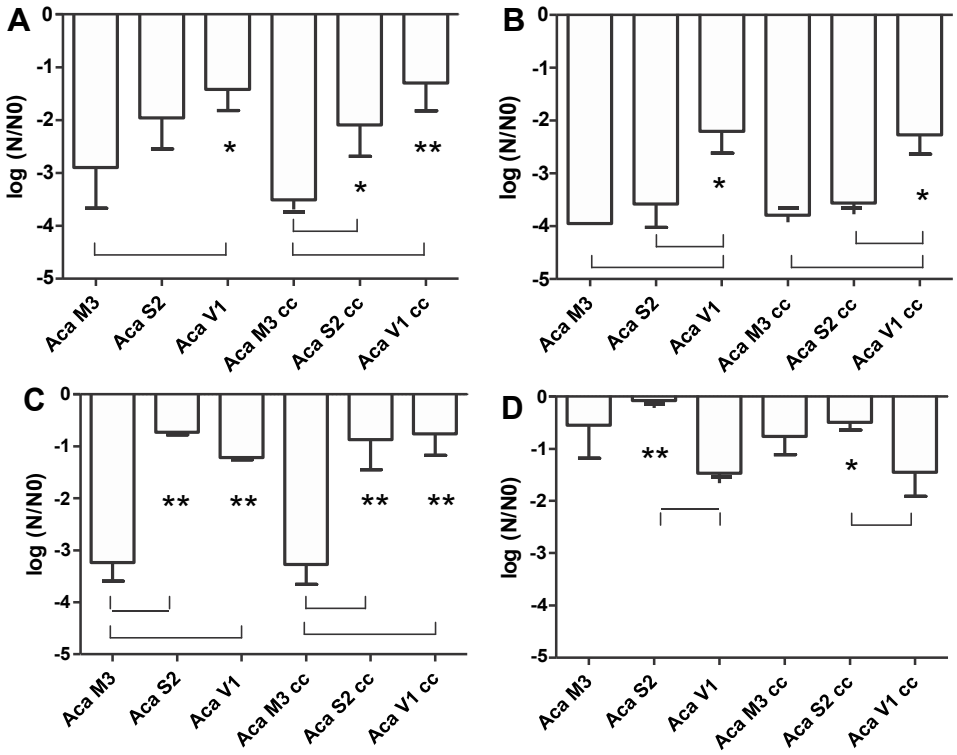


Fig. 6 e Comparison of Acanthamoeba inactivation after treatments. (A) Chlorine at 30 C, Ct ~ 5 mg min/L, (B) chlorine at 50 C, Ct ~ 5 mg min/L, (C) chlorine dioxide at 30 C, Ct ~ 5 mg min/L, and (D) monochloramine at 30 C, Ct ~ 2 mg min/L. Acanthamoeba M3, S2 and V1 were grown alone or in co-culture (cc). Values are the average calculated from three independent experiments ± standard deviation. Statistical analyses were performed by unpaired two-tailed Student's t-test (*$P < 0.005$; **$P < 0.001$).

Regarding Acanthamoeba, we show that the efficiency of the treatments clearly depends on the target strain. Similar results have been reported recently with other treatments (Coulon et al., 2010). Acanthamoeba M3 was the most sensitive strain to chlorine and chlorine dioxide but not to monochloramine. Chlorine and chlorine dioxide displayed a different inactivation pattern than monochloramine; it could be hypothesized that monochloramine should have a different mode of action as compared to the two other disinfectants. It was previously reported that L. pneumophila-infected Acanthamoeba polyphaga exhibited higher resistance to chlorine than uninfected amoeba (Garcia et al., 2007). In contrast, no significant differences of sensitivity between infected or non-infected amoebae were observed for all treatments in this study. This suggests that protection of amoeba against disinfectant conferred by L. pneumophila may be limited to specific conditions.

Regarding L. pneumophila, almost all the treatments were efficient, i.e. leading to at least a 3-log reduction of the bacterial population in our conditions. However their efficiency, estimated by the log of inactivation (Figs. 6 and 7), could be different. These results are in agreement with many studies on Legionella sensitivity to oxidizing disinfectants (Kim et al., 2002). Besides temperature seems to influence the disinfectant efficiency. Indeed, chlorine was more efficient at 50 C than at 30 C, at least on co-cultured Legionella. Similarly, chlorine was shown to be more efficient at 43 C than at 25 C on these bacteria, although chlorine decay was faster at the higher temperature (Muraca et al., 1987).

Our results clearly indicate that chlorine and chlorine dioxide were more efficient on free L. pneumophila as compared to co-cultured L. pneumophila. The difference between free and co-cultured bacteria is in agreement with the study of Garcia et al. (2007), which reported a higher resistance to chlorine of L. pneumophila when internalized within A. polyphaga. Also, Barker et al. have reported that L. pneumophila grown in Acanthamoeba were less sensitive than free bacteria to disinfectants (polyhexamethylene biguanide, benzisothiazolone and 5-chloro-N-methylisothiazolone) and antibiotics (Barker et al., 1992, 1995). It was proposed that L. pneumophila grown within amoebae were less sensitive because these bacteria undergo phenotypic modifications upon intra-cellular growth.

Interestingly, monochloramine displays a different behavior, as compared to the other treatments. Indeed, there was no difference of efficiency against the intra-cellular and free L. pneumophila with monochloramine, while other treatments were more efficient on free L. pneumophila. This behavior has not been reported before. It suggests that monochloramine has a different mode of action as compared to chlorine and chlorine dioxide.

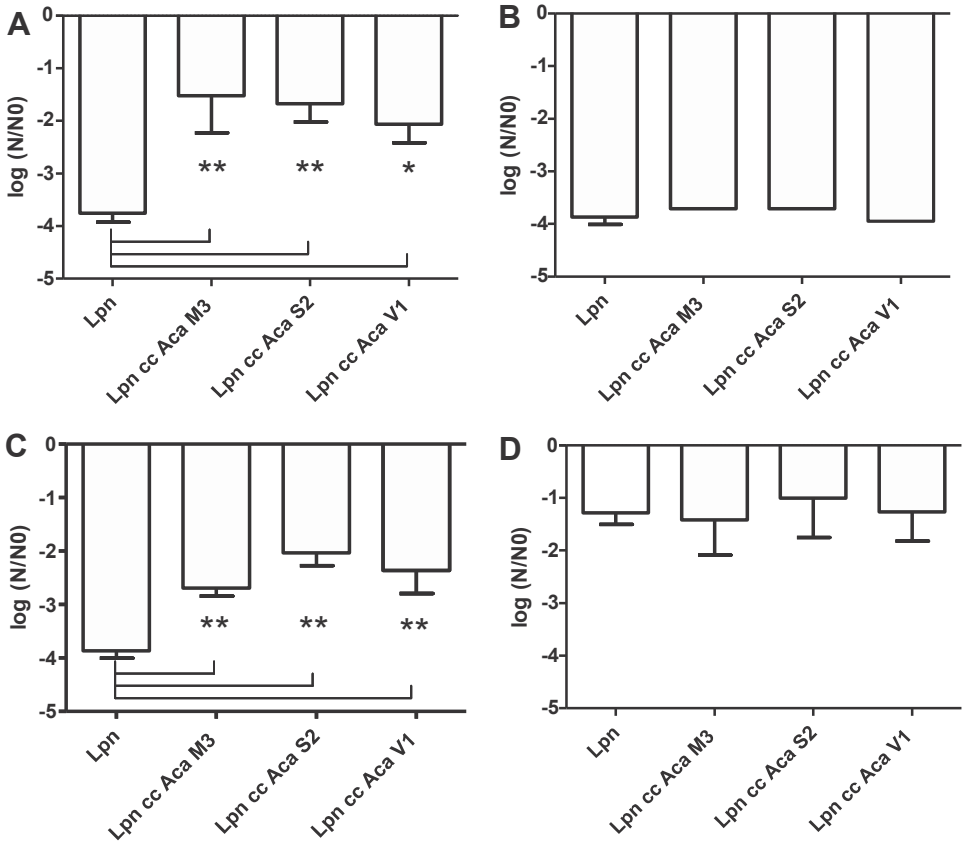


Fig. 7 e Comparison of L. pneumophila inactivation after treatments. (A) Chlorine at 30 C, Ct ~ 5 mg min/L, (B) chlorine at 50 C, Ct ~ 3 mg min/L, (C) chlorine dioxide at 30 C, Ct ~ 0.6 mg min/L, and (D) monochloramine at 30 C, Ct ~ 2 mg min/L. L. pneumophila were grown alone or in co-culture (cc) with Acanthamoeba M3, S2 or V1. Values are the average calculated from three independent experiments ± standard deviation. Statistical analyses were performed by unpaired two-tailed Student's t-test (*P < 0.005; **P < 0.001).

5. Conclusion

Our work has compared for the first time the efficiency of chlorine, chlorine dioxide and monochloramine on Acanthamoeba and L. pneumophila. All these disinfectants, at concentrations similar to those used in water systems were efficient in the conditions set up in this study. However, their efficiency may vary with the Acanthamoeba strain. Interestingly, chlorine and chlorine dioxide were less efficient when L. pneumophila was co-cultivated with Acanthamoeba while monochloramine did not display the same selectivity. The inactivation pattern of Acanthamoeba by monochloramine was also different from the two other disinfectants. It suggests that monochloramine would have a different mode of action. This hypothesis will be tested in further experiments with Acanthamoeba. With the dual purpose of protection of health and environment, our results might help to adapt treatment strategies against amoebae and L. pneumophila.

Acknowledgment

We are grateful to Pierre Pernin (University of Lyon, France), who was involved in amoebae isolation and morphological characterization. C.B. was supported by a grant from the CNRS.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.watres.2010.10.025.

references

APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twenty first ed. Washington, DC, USA.

Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., Gilbert, P., 1992. Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. Applied and Environmental Microbiology 58 (8), 2420e2425.

Barker, J., Scaife, H., Brown, M.R., 1995. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of Legionella pneumophila. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39 (12), 2684e2688.

Beattie, T.K., Seal, D.V., Tomlinson, A., McFadyen, A.K., Grimason, A.M., 2003. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most

probable number enumeration technique. Journal of Clinical Microbiology 41 (7), 2992e3000.
Bichai, F., Payment, P., Barbeau, B., 2008. Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: a review. Canadian Journal of Microbiology 54 (7), 509e524.
Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., Messi, P., 2005. Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives. Biotechnology Annual Review 11, 355e380.
Campos, C., Loret, J.F., Cooper, A.J., Kelly, R.F., 2003. Disinfection of domestic water systems for Legionella pneumophila. Journal of Water Supply: Research and Technology e AQUA 52, 341e354.
Cazalet, C., Rusniok, C., Bruggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichit, M., Jarraud, S., Bouchier, C., Vandenesch, F., Kunst, F., Etienne, J., Glaser, P., Buchrieser, C., 2004. Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nature Genetics 36 (11), 1165e1173.
Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., 2010. Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings. Journal of Clinical Microbiology 48 (8), 2689e2697.
Critchley, M., Bentham, R., 2009. The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. Journal of Applied Microbiology 106 (3), 784e789.
Cursons, R.T., Brown, T.J., Keys, E.A., 1980. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. Applied and Environmental Microbiology 40 (1), 62e66.
Donlan, R.M., Forster, T., Murga, R., Brown, E., Lucas, C., Carpenter, J., Fields, B., 2005. Legionella pneumophila associated with the protozoan Hartmannella vermiformis in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. Biofouling 21 (1), 1e7.
Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clinical Microbiology Reviews 15 (3), 506e526.
Garcia, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., Abu Kwaik, Y., 2007. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection. Environmental Microbiology 9 (5), 1267e1277.
Garduno, R.A., Garduno, 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 (11), 6273e6283.
Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., Kendall, A.M., 2002. Literature review e efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. Water Research 36 (18), 4433e4444.
King, C.H., Shotts Jr., E.B., Wooley, R.E., Porter, K.G., 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. Applied and Environmental Microbiology 54 (12), 3023e3033.
Kuchta, J.M., Navratil, J.S., Shepherd, M.E., Wadowsky, R.M., Dowling, J.N., States, S.J., Yee, R.B., 1993. Impact of chlorine and heat on the survival of Hartmannella vermiformis and subsequent growth of Legionella pneumophila. Applied and Environmental Microbiology 59 (12), 4096e4100.
Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L., Kwaik, Y.A., 2004. Cell biology of the intracellular infection by Legionella pneumophila. Microbes Infection 6 (1), 129e139.
Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Abu Kwaik, Y., 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Applied and Environmental Microbiology 71 (1), 20e28.
Muraca, P., Stout, J.E., Yu, V.L., 1987. Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing Legionella pneumophila within a model plumbing system. Applied and Environmental Microbiology 53 (2), 447e453.
Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., Donlan, R.M., 2001. Role of biofilms in the survival of Legionella pneumophila in a model potable-water system. Microbiology 147, 3121e3126.
Rose, L.J., Rice, E.W., Jensen, B., Murga, R., Peterson, A., Donlan, R.M., Arduino, M.J., 2005. Chlorine inactivation of bacterial bioterrorism agents. Applied and Environmental Microbiology 71 (1), 566e568.
Steinert, M., Hentschel, U., Hacker, J., 2002. Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. FEMS Microbiology Reviews 26 (2), 149e162.
Storey, M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J., Stenstrom, T.A., 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. Scand Journal of Infectious Diseases 36 (9), 656e662.
Taylor, M., Ross, K., Bentham, R., 2009. Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. Microbial Ecology 58 (3), 538e547.
Temmerman, R., Vervaeren, H., Noseda, B., Boon, N., Verstraete, W., 2006. Necrotrophic growth of Legionella pneumophila. Applied and Environmental Microbiology 72 (6), 4323e4328.
Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., Levi, Y., 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. Journal of Applied Microbiology 97 (5), 950e963.
Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G., 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. Applied and Environmental Microbiology 72 (4), 2428e2438.
Wintermeyer, E., Ludwig, B., Steinert, M., Schmidt, B., Fischer, G., Hacker, J., 1995. Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of Legionella pneumophila in eukaryotic cells. Infection and Immunity 63 (12), 4576e4583.

ANNEXE 6: SENSITIVITY OF FREE-LIVING AMOEBA TROPHOZOITES AND CYSTS TO WATER DISINFECTANTS

Mathieu Dupuy, Florence Berne, Pascaline Herbelin, Marie Binet, Nelsie Berthelot, Marie Hélène Rodier, Sylvie Soreau and Yann Héchard

Int. J. Hyg. Environ. Health (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007

International Journal of Hygiene and Environmental Health xxx (2013) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijheh

Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants

Mathieu Dupuy[a], Florence Berne[b], Pascaline Herbelin[c], Marie Binet[c], Nelsie Berthelot[d], Marie-Hélène Rodier[a], Sylvie Soreau[c], Yann Héchard[a,*]

[a] Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, CNRS UMR 7267, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France
[b] Université de Poitiers, IC2MP, CNRS UMR 7285, 1 rue Marcel Doré, 86022 Poitiers Cedex, France
[c] EDF, Division Recherche et Développement, 6 Quai Watier, 78401 Chatou, France
[d] VERI, Veolia Environnement, Chemin de la digue BP76, 78603 Maisons Laffitte Cedex, France

article info

Article history:
Received 11 March 2013
Received in revised form 10 July 2013
Accepted 11 July 2013

Keywords:
Amoeba
Water
Treatment
Disinfectant
Chlorine
Cyst

abstract

Free-living amoebae are naturally present in water. These protozoa could be pathogenic and could also shelter pathogenic bacteria. Thus, they are described as a potential hazard for health. Also, free-living amoebae have been described to be resistant to biocides, especially under their cyst resistant form. There are several studies on amoeba treatments but none of them compare sensitivity of trophozoites and cysts from different genus to various water disinfectants. In our study, we tested chlorine, monochloramine and chlorine dioxide on both cysts and trophozoites from three strains, belonging to the three main genera of free-living amoebae. The results show that, comparing cysts to trophozoites inactivation, only the Acanthamoeba cysts were highly more resistant to treatment than trophozoites. Comparison of the disinfectant efficiency led to conclude that chlorine dioxide was the most efficient treatment in our conditions and was particularly efficient against cysts. In conclusion, our results would help to adapt water treatments in order to target free-living amoebae in water networks.

© 2013 Published by Elsevier GmbH.

Introduction

Free-living amoebae (FLA) are a heterogeneous group of protozoa, comprising several genera. They are ubiquitously found in natural environments, such as water and soils (Rodriguez-Zaragoza, 1994), as well as in artificial environments, such as water networks and cooling towers (Berk et al., 2006). Among FLA found in the environment and in water networks, Acanthamoeba, Hartmannella and Naegleria are the most common genera but other genera such as, Vahlkampfia, Balamuthia, Willaertia and Nuclearia can be found occasionally (Critchley and Bentham, 2009; Loret and Greub, 2010; Thomas and Ashbolt, 2011). Most FLA can exist in at least two forms: a vegetative trophozoite form, which is able to feed, move and divide, and a dormant cyst form, which is inactive. The differentiation process leading to the cyst, known as encystment, is triggered by nutritional or osmotic stresses (Fouque et al., 2012).

FLA has been described as reservoirs for several pathogenic bacteria, such as Legionella, Mycobacterium and Chlamydia (Corsaro et al., 2010; Molmeret et al., 2005; Thomas et al., 2009). Indeed, FLA ingest bacteria by phagocytosis but some bacteria are able to resist amoebal phagocytosis and, consequently, to survive within FLA. These bacteria are collectively named amoeba-resisting bacteria (ARB) (Greub and Raoult, 2004) and some of them, such as Legionella pneumophila, are even able to multiply within FLA (Rowbotham, 1980). For L. pneumophila, FLA are likely to be the main reservoirs in the environment (Borella et al., 2005). Furthermore, after intra-amoebal growth, L. pneumophila become more virulent than BCYE-grown L. pneumophila (Molmeret et al., 2005) and more resistant to treatments (Barker et al., 1992). In addition, L. pneumophila, as well as other bacteria, can also be found within FLA cysts (Kilvington and Price, 1990; Skinner et al., 1983) leading to higher resistance, since cysts can provide a physical barrier to treatments. Thus, FLA has been described recently as by-passes because they are able to protect bacteria from water treatments (Loret and Greub, 2010). Besides, some FLA is pathogenic for humans and are responsible for keratitis and infections of the central nervous system (Schuster and Visvesvara, 2004; Visvesvara et al., 2007). Naegleria fowleri is responsible for a rare but acute primary amoebic meningoencephalitis and Acanthamoeba for keratitis or granulomatous amoebic encephalitis.

As FLA may be pathogenic or able to bear pathogenic bacteria, efforts have been made to find efficient treatments against FLA in water networks (Critchley and Bentham, 2009). In order to prevent the development of pathogenic bacteria, such as L. pneumophila, in water networks, many treatments have been evaluated (Kim et al., 2002). Besides, there are few publications dealing with FLA

* Corresponding author. Tel.: +33 5 49 45 40 07; fax: +33 5 49 45 35 03.
E-mail address: yann.hechard@univ-poitiers.fr (Y. Héchard).

1438-4639/$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier GmbH.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007

Please cite this article in press as: Dupuy, M., et al., Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. Int. J. Hyg. Environ. Health (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007

treatment (Critchley and Bentham, 2009; Cursons et al., 1980; De Jonckheere and van de Voorde, 1976; Kuchta et al., 1993). These studies indicate that Acanthamoeba is often the less sensitive genus (Cursons et al., 1980; De Jonckheere and van de Voorde, 1976) and that environmental strains might be less sensitive than collection strains (Coulon et al., 2010). However, it remains difficult to compare precisely the efficiency of these treatments as experimental procedures are different and Ct values are not always reported (Loret and Greub, 2010).

In our study, we compared the effectiveness of three water disinfectants on trophozoites and cysts of FLA strains belonging to the Acanthamoeba, Naegleria and Hartmannella genera. Treatments were performed and inactivation was reported in terms of Ct values for each condition. Finally, the sensitivity of the cysts and the trophozoites was compared.

Materials and methods

FLA isolation and culture

FLA strains from water samples from different sources were collected by Anjou Recherche (Maisons-Laffitte, France) and Electricité De France (EDF, Chatou, France). A drop of water was placed onto a non-nutrient agar plate (made only with water and agar 15 g/L), seeded with a lawn of Escherichia coli XL1 Blue (Stratagene). This medium is referred to as NNA-Eco. Plates were incubated at various temperatures and examined daily for 7–14 days. After FLA growth (indicated by a lysis zone), an isolate was transferred onto a fresh NNA-Eco plate. Strains were axenised by transfer into an axenic broth 1034 medium (peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L, ribonucleic acid 1 g/L, folic acid 15 mg/L, hemin 1 mg/L, KH_2PO_4 0.36 g/L, Na_2HPO_4 0.5 g/L, pH 6.5) containing antibiotics (ampicillin 200 mg/mL and streptomycin 200 mg/mL). For the Hartmannella 1534 strain, culture in axenic 1034 medium was not possible. This strain was cultivated in amoeba buffer (2.5 mM KH_2PO_4, 4 mM $MgSO_4$, 0.5 mM $CaCl_2$, 2.5 mM Na_2HPO_4, 0.05 mM $(NH_4)_2FeII(SO_4)^2$) supplemented with E. coli XL1 blue at a concentration of 5.10^8 bacteria per mL, and incubated at 37 °C.

Cyst production

Cysts were produced from a culture of trophozoites. For the strains of Acanthamoeba and Hartmannella, the encystment was induced by incubating trophozoites in the encystment buffer (K_2HPO_4 47 mM, KH_2PO_4 à 3 mM, $CaCl_2$ 0,4 mM, $NaHCO_3$ 1 mM, KCl 100 mM, pH 8). Then, the cultures were placed at room temperature for 15 days. For the Naegleria strain, axenic 1034 medium have replaced by a buffer composed by 90% of amoeba buffer completed with 10% of axenic 1034 medium. Then, the Naegleria trophozoites have been placed at 4 °C for 15 days.

Amoeba identification

DNA was extracted from amoeba cells using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey Nagel). An 18S rDNA PCR was performed with primers Ami6F1 and Ami9R, as described previously (Thomas et al., 2006). The amplicons were sequenced with each primer using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and analysed using the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Disinfection treatments

Three different disinfectants, commonly used by industries to disinfect their networks and circuits, were used: chlorine, chlorine dioxide and monochloramine. The treatments were performed at 30 °C. For trophozoite disinfection, the initial concentrations were as follows: chlorine 3 mg Cl_2/L (to provide approximately 1 mg Cl_2/L residual after 1 h), chlorine dioxide 0.6 mg/L and monochloramine 0.8 mg Cl_2/L. For cyst disinfection, the doses were adapted to provide a 3-log reduction during the treatment time. For the chlorine treatments, the initials doses applied were 50 mg/L for Acanthamoeba, 3 mg/L for Naegleria and 10 mg/L for Hartmannella. For the chlorine dioxide treatments, the doses applied were 6 mg/L for Acanthamoeba, 0.6 mg/L for Naegleria and 1 mg/L for Hartmannella. Finally, for the monochloramine treatments, the doses applied were 15 mg/L for Acanthamoeba, 0.8 mg/L for Naegleria and 3 mg/L for Hartmannella.

All of the solutions were prepared from reagent grade chemicals and deionised water. Stock solutions were stored at 4 °C. All glassware was cleaned with chlorine (100 mg/L) for at least one hour and carefully rinsed with deionised water. The chlorine solution was freshly prepared by diluting sodium hypochlorite (13%, ACROS Organics). The chlorine concentration was measured using the 4500-Cl G DPD method (APHA, 2005) before and during treatment in order to determine the residual concentration. The stock solution of monochloramine was obtained by adding free chlorine to a solution of ammonium chloride under agitation, with a chlorine-to-nitrogen molar ratio of 0.5 and a pH of 8.5. The final concentration of the stock solution of monochloramine was 2 mM (or approximately 140 mg Cl_2/L). A stock solution of chlorine dioxide was prepared by slowly adding sulphuric acid to a sodium chlorite solution and then by collecting the gaseous chlorine dioxide produced in ultrapure water using the 4500-ClO2 B method (APHA, 2005). The concentration of the stock solution was around 400 mg/L. The DPD method was also used to measure the residual concentration of monochloramine and chlorine dioxide. Treatment with chlorine, monochloramine and chlorine dioxide was stopped by adding sterile sodium thiosulphate (0.1 M).

Before each treatment, 1 mL of FLA suspension was transferred into 100 mL of sterile phosphate buffer (50 mM, pH 8), leading to a concentration of 10^4 cell/mL. The sample was incubated at 30 °C under agitation and disinfectant was added. The concentration of the disinfectant and the survival of the FLA (trophozoites and cysts) were followed after 0, 2, 30 and 60 min of treatment. The disinfectant exposure was quantified by Ct (concentration × time, in mg min/L), which corresponds to the geometric area below the disinfectant decay curve. Microbial inactivation (loss of cultivability) was recorded as a function of Ct, to evaluate the effectiveness of the disinfectants. Ct tables have been developed for some waterborne pathogens to indicate the conditions necessary for a 2-log ($Ct_{99\%}$) or 3-log ($Ct_{99.9\%}$) inactivation (King et al., 1988; Rose et al., 2005).

Survival of amoeba

The survival of FLA (trophozoites and cysts) was determined using the most probable number (MPN) procedure (Beattie et al., 2003). Various volumes (1, 0.1, 0.01 and 0.001 mL) of each sample were inoculated onto NNA-Eco plates. Each inoculation was performed in quintuplicate. Plates were incubated for 15 days at different temperatures depending on the genus of amoeba tested: 25 °C for Acanthamoeba V1, 30 °C for Naegleria E1 and 37 °C for Hartmannella 1534. Each plate was examined for the presence or absence of microbial growth and the results were reported using an MPN table (Beattie et al., 2003). The low and high limits of detection were 1.8×10^2 NPP/L and 1.6×10^6 NPP/L, leading to a maximum amplitude of 3.94 log.

Please cite this article in press as: Dupuy, M., et al., Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. Int. J. Hyg. Environ. Health (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007

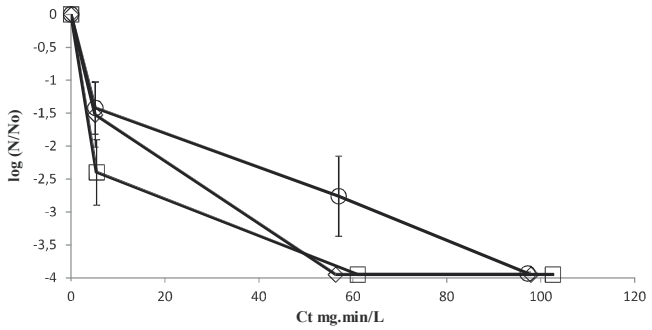


Fig. 1. Inactivation of trophozoites after chlorine treatment. Acanthamoeba V1 ( ), Naegleria E1 ( ) and Hartmannella 1534 (♦) were treated for 60 min and the survival was counted using the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

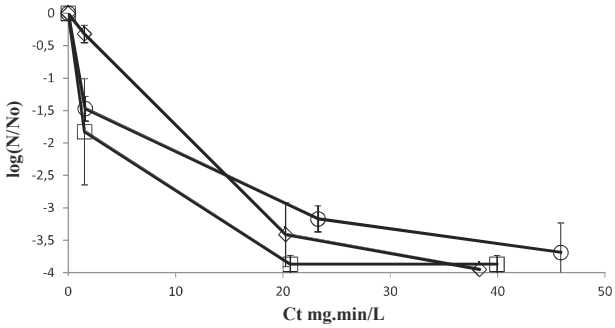


Fig. 2. Inactivation of trophozoites after monochloramine treatment. Acanthamoeba V1 ( ), Naegleria E1 ( ) and Hartmannella 1534 (♦) were treated for 60 min and the survival was counted using the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

Results and discussion

Identification of amoeba strains

In order to test the disinfectants' activity on freshly isolated environmental strains, we isolated several FLA strains from water networks on NNA-coli plates. We then tried to axenise them in order to grow them in a culture medium. Acanthamoeba V1 was already axenised during a previous study (Dupuy et al., 2011). In the present study, a new strain, morphologically similar to Naegleria, was axenised in the 1034 medium. To confirm the identification of the Naegleria strain, a partial sequence of the 18S rDNA gene was amplified by PCR and sequenced (GenBank JX876609). The sequence was 99% identical to sequences of Naegleria (first entry Naegleria lovaniensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, U80062.1, score 1164), confirming that this strain belongs to the Naegleria genus. However, no Hartmannella strain was axenised as the strain encysted in the absence of bacteria. Thus, we used a collection strain, Hartmannella CCAP 1534/7A, cultivated in amoeba buffer and supplemented with E. coli at a concentration of 5×10^8 bacteria per mL.

Trophozoite inactivation

The primary aim of our study was to compare the effectiveness of three disinfectants (chlorine, monochloramine and chlorine dioxide) on each strain representing three genera: Acanthamoeba, Naegleria and Hartmannella. The treatment doses were chosen to be realistic and representative of actual practices in water network disinfection. The doses were expressed in terms of Ct (mg min/L) allowing a comparison between the disinfectants. After treatment, the inactivation (loss in cultivability) of the trophozoites was estimated using the MPN method and represented in function of Ct. The results with chlorine suggest that Acanthamoeba V1 is less sensitive to chlorine than Hartmannella 1534 which, in turn, is less sensitive than Naegleria E1 (Fig. 1 and Table 1). With monochloramine, Naegleria E1 was somehow more sensitive than the other two strains (Fig. 2). Finally, with chlorine dioxide, Naegleria E1 was clearly more sensitive than the other strains (Fig. 3). A rough comparison between Figs. 1–3 suggests that, under our conditions, chlorine dioxide and monochloramine are more efficient (lower Ct) than chlorine. These results are in accordance with the few other studies that compare these disinfectants on various genera of FLA (Critchley and Bentham, 2009; Cursons et al., 1980).

Table 1
Ct for a 2-log reduction ($Ct_{99\%}$) of trophozoites or cysts. The three strains were treated with chlorine, monochloramine and chlorine dioxide. The dose is expressed as Ct (in mg min/L).

	Chlorine	Monochloramine	Chlorine dioxide
Acanthamoeba V1 trophozoites	28	8	>5
Naegleria E1 trophozoites	5	3	1
Hartmannella 1534 trophozoites	15	12	5
Acanthamoeba V1 cysts	865	352	35
Naegleria E1 cysts	29	13	1
Hartmannella 1534 cysts	156	34	1

Cyst inactivation

In order to compare the efficiency of the three treatments on cysts, cysts of each strain were treated and inactivation was plotted against the disinfectant dose (Ct in mg min/L). With chlorine (Fig. 4), the results clearly show that Acanthamoeba V1 was less sensitive than the other two strains, and that Naegleria E1 seemed more sensitive than Hartmannella 1534. Similar behaviour could be seen with monochloramine and chlorine dioxide (Figs. 5 and 6), although there was no difference between Naegleria E1 and Hartmannella 1534 in terms of their sensitivity to chlorine dioxide. These results suggest that cysts of Acanthamoeba are likely less sensitive than cysts of other genera. Although our hypothesis is based only on one strain per genus, these results corroborate previous studies in which Acanthamoeba sp. have been reported to be highly resistant to different treatments such as chlorine, bromine and isothiazolinone (Critchley and Bentham, 2009; De Jonckheere and van de Voorde, 1976). However, no Ct value has been reported in these publications, preventing the comparison of disinfectant efficiency. A rough comparison between Figs. 4–6 suggests that chlorine dioxide is the most efficient disinfectant for cyst inactivation. Finally, it should be underlined that some studies have described that cyst

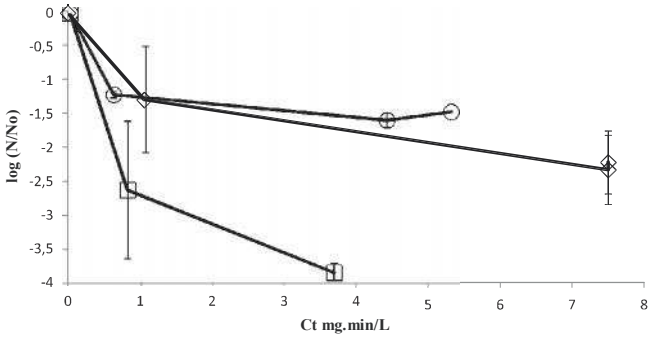


Fig. 3. Inactivation of trophozoites after chlorine dioxide treatment. Acanthamoeba V1 ( ), Naegleria E1 ( ) and Hartmannella 1534 (♦) were treated for 60 min and the survival was counted using the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

Please cite this article in press as: Dupuy, M., et al., Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. Int. J. Hyg. Environ. Health (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007

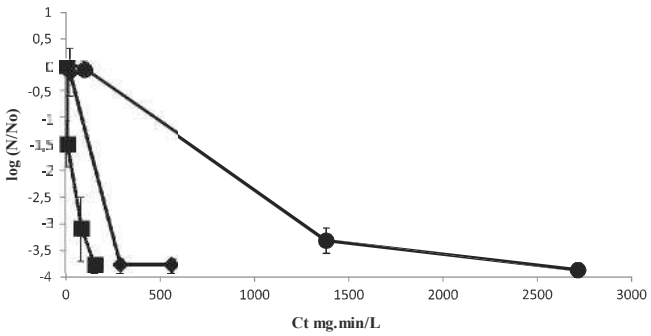


Fig. 4. Inactivation of cysts after chlorine treatment. Acanthamoeba V1 ( ), Naegleria E1 ( ) and Hartmannella 1534 ( ) were treated for 60 min and the survival was counted using the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

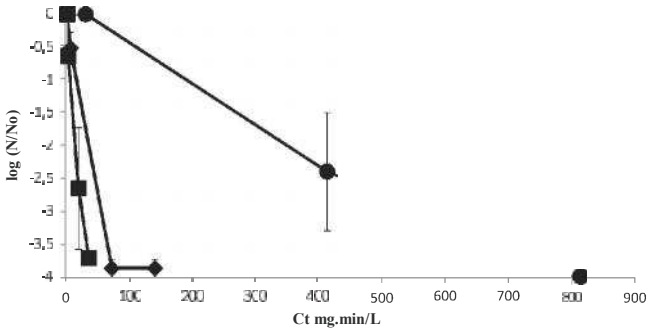


Fig. 5. Inactivation of cysts after monochloramine treatment. Acanthamoeba V1 ( ), Naegleria E1 ( ) and Hartmannella 1534 ( ) were treated for 60 min and the survival was counted using the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

resistance to treatment could be dependent on encystment method (Coulon et al., 2012; Hughes et al., 2003). Therefore, it might be difficult to compare cyst resistance between different studies because of the use of different strains, and encystment methods. Due to these limitations, the comparison between strains should be cautiously extended to the comparison between genera.

Comparison between cyst and trophozoite inactivation

Finally, on the basis of the above results, we estimated the Ct values for 2-log inactivation ($Ct_{99\%}$) to compare cyst and trophozoite sensitivity (Table 1). Cysts of Acanthamoeba V1 were between 7 and 45 times as resistant as trophozoites. Cysts of Hartmannella 1534 and Naegleria E1 were also more resistant than trophozoites, but

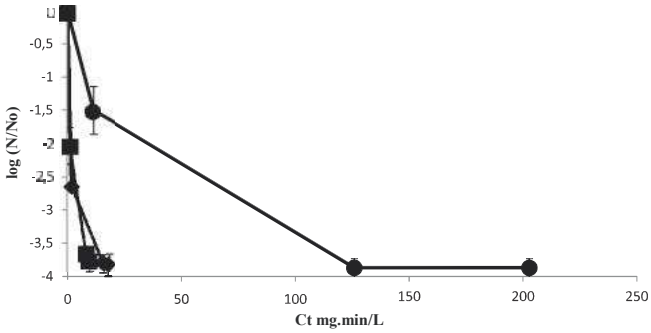


Fig. 6. Inactivation of cysts after chlorine dioxide treatment. Acanthamoeba V1 ( ), Naegleria E1 ( ) and Hartmannella 1534 ( ) were treated for 60 min and the survival was counted using the MPN method. Bars represent standard errors of the means of three independent experiments.

to a lesser extent, and only with chlorine. Even with chlorine dioxide, trophozoites of Hartmannella 1534 appeared somewhat more resistant than cysts, which was most likely due to the low precision of the method, especially with low Ct values. A previous study concluded that Hartmannella vermiformis trophozoites were barely more resistant to chlorine than cysts (Kuchta et al., 1993).

Recently, Loret & Greub compiled inactivation data from the results of various studies and estimated the $Ct_{99\%}$ for the disinfection of Naegleria and Acanthamoeba cysts (Loret and Greub, 2010). In our study, $Ct_{99\%}$ values were estimated by computing from the inactivation curves; these are reported in Table 1. According to their estimation for chlorine treatment, the $Ct_{99\%}$ for Naegleria cysts was between 9 and 30 mg min/L and for Acanthamoeba cysts was between 1200 and 6500 mg min/L. In our work, the $Ct_{99\%}$ values were similar i.e. 29 mg min/L for Naegleria E1 cysts and 865 mg min/L for Acanthamoeba V1 cysts. For monochloramine treatment, the sensitivity of Naegleria cysts has been estimated only by Loret ($Ct_{99\%}$ 23–237 mg min/L). In our study, the $Ct_{99\%}$ (13 mg min/L) was close to the lowest Ct. Finally for chlorine dioxide treatment, the $Ct_{99\%}$ for Naegleria cysts was between 1 and 3 mg min/L and for Acanthamoeba cysts was 20 mg.min/L. Again, our results for this treatment were similar ($Ct_{99\%}$ 1 mg.min/L for Naegleria and 35 mg min/L for Acanthamoeba). Our results are generally in agreement with the estimations made by Loret & Greub and the values reported in literature. Additionally, for the first time, our results give a Ct comparison for three genera treated with these three disinfectants under the same conditions.

These differences between the cysts of the three strains may reflect variability in cyst envelope composition. Indeed, it has been suggested that resistance may be due to physical protection by the cyst wall. It has been clearly shown that Acanthamoeba cysts are more resistant than trophozoites (Coulon et al., 2010; Lloyd et al., 2001; Turner et al., 2000). This could be due to the double-layered wall that is partially composed of cellulose. An increase in cellulose content has been related to an increase in biocide resistance (Turner et al., 2000). For Naegleria, it is not clear whether there are one or two layers and whether there is cellulose in the wall. The Hartmannella cyst wall has been poorly described: one study reported that there were two layers (Smirnov and Michel, 1999) and another that there was a small quantity of cellulose in the envelope (4.2% compared to 30% in Acanthamoeba) (Upadhyay et al., 1984).

Finally, only the Acanthamoeba cysts appeared to be much more resistant than the trophozoites, especially with regard to chlorine and monochloramine, underlying the specificity of this FLA genus. Furthermore, encystment seemed to provide little or no protection against chlorine dioxide treatment, especially for the Naegleria and the Hartmannella genera. This emphasises that these treatments should have different modes of action, as suggested previously (Mogoa et al., 2011). Finally, under our conditions it can be concluded that chlorine dioxide is the most efficient treatment (lowest Ct) for FLA disinfection. Chlorine dioxide is likely to be more potent in penetrating the cysts while maintaining its efficiency. In a previous study, which reported the cellular response of Acanthamoeba to these treatments, chlorine dioxide treatment had a major effect on the cytoplasm i.e. high vacuolisation as seen by electronic microscopy (Mogoa et al., 2011).

In conclusion, for the first time, our study provides Ct comparisons for three strains belonging to three genera treated with three commonly used water disinfectants. First, our results demonstrated that Acanthamoeba cysts were far more resistant than Acanthamoeba trophozoites, but to a lesser extent with chlorine dioxide. Second, Hartmannella and Naegleria cysts were somewhat more resistant than trophozoites with chlorine only. Third, it confirms that Acanthamoeba cysts are likely more resistant than cysts of the two other genera. It has been hypothesised that this could be due to the composition of their protective envelope. Fourth,

Please cite this article in press as: Dupuy, M., et al., Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. Int. J. Hyg. Environ. Health (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007

chlorine dioxide appeared to be the most efficient disinfectant (lowest $Ct_{99\%}$) under our conditions and by comparing the intrinsic efficiency of biocides, ahead of monochloramine and chlorine, and poorly dependent on encystment. This suggests that chlorine dioxide should have a specific mode of action. However, these tests were performed in laboratory conditions without considering chemical aspects which take place in the cooling tower (chemical consummation, evaporation loss. . .) and which will modulate the effectiveness of biocides. Finally, our results underline the need to further our knowledge of FLA inactivation in order to improve the disinfection of water networks.

Acknowledgment

The authors want to acknowledge Julie Huguet for the technical help.

References

Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., Gilbert, P., 1992. Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2420–2425.

Beattie, T.K., Seal, D.V., Tomlinson, A., McFadyen, A.K., Grimason, A.M., 2003. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. J. Clin. Microbiol. 41, 2992–3000.

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, 7440–7444.

Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., Messi, P., 2005. Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives. Biotechnol. Annu. Rev. 11, 355–380.

Corsaro, D., Pages, G.S., Catalan, V., Loret, J.F., Greub, G., 2010. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. Int. J. Hyg. Environ. Health 213, 158–166.

Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., 2010. Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings. J. Clin. Microbiol. 48, 2689–2697.

Coulon, C., Dechamps, N., Meylheuc, T., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., 2012. The effect of in vitro growth conditions on the resistance of Acanthamoeba cysts. J. Eukaryot. Microbiol. 59, 198–205.

Critchley, M., Bentham, R., 2009. The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. J. Appl. Microbiol. 106, 784–789.

Cursons, R.T., Brown, T.J., Keys, E.A., 1980. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 40, 62–66.

De Jonckheere, J., van de Voorde, H., 1976. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic Naegleria and Acanthamoeba by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 31, 294–297.

Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Menard-Szczebara, F., Oberti, S., Rodier, M.H., Soreau, S., Wallet, F., Hechard, Y., 2011. Efficiency of water disinfectants against Legionella pneumophila and Acanthamoeba. Water Res. 45, 1087–1094.

Fouque, E., Trouilhe, M.C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.H., Hechard, Y., 2012. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. Eukaryot. Cell 11, 382–387.

Greub, G., Raoult, D., 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin. Microbiol. Rev. 17, 413–433.

Hughes, R., Heaselgrave, W., Kilvington, S., 2003. Acanthamoeba polyphaga strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3080–3084.

Kilvington, S., Price, J., 1990. Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure. J. Appl. Bacteriol. 68, 519–525.

Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., Kendall, A.M., 2002. Literature review – efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. Water Res. 36, 4433–4444.

King, C.H., Shotts Jr., E.B., Wooley, R.E., Porter, K.G., 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. Appl. Environ. Microbiol. 54, 3023–3033.

Kuchta, J.M., Navratil, J.S., Shepherd, M.E., Wadowsky, R.M., Dowling, J.N., States, S.J., Yee, R.B., 1993. Impact of chlorine and heat on the survival of Hartmannella vermiformis and subsequent growth of Legionella pneumophila. Appl. Environ. Microbiol. 59, 4096–4100.

Lloyd, D., Turner, N.A., Khunkitti, W., Hann, A.C., Furr, J.R., Russell, A.D., 2001. Encystation in Acanthamoeba castellanii: development of biocide resistance. J. Eukaryot. Microbiol. 48, 11–16.

Loret, J.F., Greub, G., 2010. Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. Int. J. Hyg. Environ. Health 213, 167–175.

Mogoa, E., Bodet, C., Morel, F., Rodier, M.H., Legube, B., Hechard, Y., 2011. Cellular response of the amoeba Acanthamoeba castellanii to chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine treatments. Appl. Environ. Microbiol. 77, 4974–4980.

Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Abu Kwaik, Y., 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 71, 20–28.

Rodriguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of free-living amoebae. Crit. Rev. Microbiol. 20, 225–241.

Rose, L.J., Rice, E.W., Jensen, B., Murga, R., Peterson, A., Donlan, R.M., Arduino, M.J., 2005. Chlorine inactivation of bacterial bioterrorism agents. Appl. Environ. Microbiol. 71, 566–568.

Rowbotham, T.J., 1980. Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol. 33, 1179–1183.

Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int. J. Parasitol. 34, 1001–1027.

Skinner, A.R., Anand, C.M., Malic, A., Kurtz, J.B., 1983. Acanthamoebae and environmental spread of Legionella pneumophila. Lancet 2, 289–290.

Smirnov, A.A., Michel, R., 1999. New data on the cyst structure of Hartmannella vermiformis Page, 1967 (lobosea, Gymnamoebia). Protistology 1, 82–85.

Thomas, J.M., Ashbolt, N.J., 2011. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? Environ. Sci. Technol. 45, 860–869.

Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G., 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2428–2438.

Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.Y., 2009. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. FEMS Microbiol. Rev. 34, 231–259.

Turner, N.A., Russell, A.D., Furr, J.R., Lloyd, D., 2000. Emergence of resistance to biocides during differentiation of Acanthamoeba castellanii. J. Antimicrob. Chemother. 46, 27–34.

Upadhyay, J.M., Crow, S., Cox, A., 1984. The cyst wall composition of Hartmannella glebae. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 175, 424–428.

Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp. Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 50, 1–26.

Please cite this article in press as: Dupuy, M., et al., Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. Int. J. Hyg. Environ. Health (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007

Résumé:
Legionella est une bactérie pathogène, ubiquitaire des environnements aqueux. L'utilisation des eaux de surface, par les centrales électriques, provoque un réchauffement de ces eaux, qui associé aux conditions de fonctionnement peut entraîner sa prolifération. Afin de limiter le développement de cette bactérie, en deçà des seuils réglementaires, EDF met en œuvre un traitement à la monochloramine dans ses circuits. Notre étude a eu pour but d'améliorer les connaissances sur les associations entre les légionelles et leur principal hôte : les amibes, et sur les facteurs susceptibles d'influencer leur sensibilité au traitement biocide. Nous avons, tout d'abord, mis en évidence la permissivité de 12 souches d'amibes à 2 souches de *L. pneumophila*. La température est apparue comme le paramètre le plus influant, la prolifération de *Legionella* semble favorisée à 40°C. Puis, nous avons cherché à développer un protocole pour séparer *Legionella* selon son état d'association. Ce protocole n'est pas abouti à l'heure actuelle. Finalement, nous avons comparé la sensibilité, de *Legionella*, dans différents états physiologiques et étudié l'impact de la qualité de l'eau et des MES. Les cellules post-amibes et dans une moindre mesure, les cellules en phases stationnaires sont les moins sensibles. L'effet de la matrice a été mis en évidence pour l'eau de Vienne, par contre la sensibilité n'a pas été modifiée suite à l'élimination ou l'enrichissement en MES. Cette étude constitue une base de connaissances nouvelles pour orienter les choix de gestion du traitement anti-*Legionella* à la monochloramine et d'exploitation des circuits.

Mots clefs : *Legionella*, amibes, multiplication, kystes, trophozoites, monochloramine, séparation, eau, MES, traitement

---

Abstract :
Legionella is a pathogenic gram negative bacterium, ubiquitously found in waterborne environment. The use of surface water, in open recirculating cooling circuits of power plants, causes a warming of these waters, which may cause proliferation of *Legionella*. To limit the development of this bacterium, under the legal thresholds, EDF implements a monochloramine treatment. The aim of our study was to improve the knowledge on the association between *Legionella* and their main host : amoebae, and on the factors that may influence their susceptibility to biocide treatment. We first showed the permissiveness of 12 strains of amoebae to 2 strains of *L. pneumophila*. Temperature is appeared as the most influential parameter, the proliferation of *Legionella* seems favored at 40°C. Then, we searched to develop a protocol to quantify *Legionella* according to its state of association. This protocol is not operational, yet. Finally, we compared the sensitivity of *Legionella*, under different physiological states and studied the impact of water quality and suspended matter. Post-amoeba cells and at a lesser extent, stationary cells, are the less sensitive. The effect of the matrix was demonstrated for the Vienne river water, on the other side the elimination or enrichment in suspended matter has not modified the sensitivity. This study provides a basis for a better knowledge to manage monochloramine treatment against *Legionella*, and for operating cooling systems.

Keywords : *Legionella*, amoebae, cysts, proliferation, trophozoites, monochloramine, separation, water, SEM, treatment