CARACTERISATION DE L'EXPOSITION A LEGIONELLA AEROPORTEE: ASPECTS METROLOGIQUES ET ApPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC

Magali Deloge-Abarkan

▶ **To cite this version:**

Magali Deloge-Abarkan. CARACTERISATION DE L'EXPOSITION A LEGIONELLA AEROPORTEE: ASPECTS METROLOGIQUES ET ApPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC. Santé. Université de Nancy 1, 2006. Français. NNT : . tel-03723193

HAL Id: tel-03723193
https://hal.science/tel-03723193

Submitted on 14 Jul 2022

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

ppn 127477218
Bib 196049
T/D/PH/N/2006/119

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I
2006

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE - SANTE - ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

Spécialité

CHIMIE ET MICROBIOLOGIE DE L'EAU

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

par

Magali DELOGE - ABARKAN

CARACTERISATION DE L'EXPOSITION A *LEGIONELLA* AEROPORTEE :

ASPECTS METROLOGIQUES ET APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC

Soutenue le 12 septembre 2006 devant le jury composé de :

Mme I. MOMAS, Professeur, Université Paris 5, Paris	Rapporteur
M. J. FRERE, Professeur, Université de Poitiers, Poitiers	Rapporteur
M. D. ZMIROU-NAVIER, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy	Directeur de thèse
Mme L. MATHIEU, Maître de Conférences, EPHE, Nancy	Encadrante
M. E. ROBINE, Ingénieur, CSTB, Champs sur Marne	Examinateur
M. P.A. CABANES, Docteur, EDF, Paris	Invité

« Tout travail scientifique est incomplet - qu'il soit d'observation ou d'expérimentation. Tout travail scientifique est susceptible d'être questionné ou modifié par un savoir qui change. Cela ne nous confère pas le droit d'ignorer le savoir que nous avons déjà, ni celui de différer une action que celui-ci semble requérir à un certain moment. »

Sir Austin Bradford Hill,
The environment and disease : Association or causation ? 1965

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire Service d'Etudes et de Recherche en Environnement et Santé (DESP [EP]²R) de l'Université Henri Poincaré - Nancy I. Il s'intègre dans un vaste programme de recherche, LEGION'AIR conduit par les appuis financiers de sociétés industrielles et organisations administratives à qui je tiens à exprimer toute ma gratitude : ADEME (bourse de thèse), EDF (cofinancement de thèse), Véolia Environnement, DGS, AFSSET et par le soutien de la DRASS et des DDASS de Lorraine.

Je remercie le Professeur Philippe HARTEMANN pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et le Professeur Denis Zmirou, à qui la direction de cette thèse a été confiée et qui a su, malgré un temps précieux et cher, m'initier aux secrets de l'épidémiologie.

Je tiens à adresser les plus sincères remerciements à Laurence Mathieu, pour m'avoir fait confiance de porter à terme le projet qu'elle a mis tant de cœur à mettre sur pied, mais surtout pour avoir dirigé ce travail de très près pendant ces quatre années de recherche. Ses compétences et sa rigueur scientifique, qui la caractérisent, m'ont permis d'acquérir savoir, savoir faire et faire valoir que j'espère conserver durant ma carrière qui commence.

Merci aux Professeurs Isabelle Momas et Jacques Frère qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail et d'y attacher une attention toute particulière.

Je suis très reconnaissante envers Enric Robine pour m'avoir accueillie à plusieurs reprises au sein du laboratoire du CSTB, de m'avoir fait profiter de discussions scientifiques très enrichissantes mais aussi pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Pierre-André Cabanes pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et d'être membre du jury de thèse.

A tous les membres actifs du projet LEGION'AIR : Caroline L., Magali B., Nadia D., Nathalie D., Paul T. et Renaud S., merci et encore merci. Un grand merci à Danièle P. pour son aide sans égal, son grand cœur et pour sa phrase préférée : « j'y crois pas ! », ça va me manquer .... A Aude F. et Annick V. pour leur aide technique. J'exprime mes remerciements envers Lahoucine B. et Lory M., pour leurs heures passées devant l'ordinateur à se torturer les méninges, et sans qui, une grande partie de ce travail ne serait pas ce qu'elle est.

Bien entendu, je remercie l'ensemble des membres du laboratoire qui ont fait en sorte qu'il soit agréable d'y travailler et d'y vivre au quotidien, notamment : Oussama A., Céline B., Sarah S., Thomas J., Thomas C., Philippe B., Adrien D., Sylvie K., Magali A., Chantal F. et Michel J..

Une mention toute particulière est adressée aux amis pour leur aide et leur soutien.

Enfin, je voudrais dédier ce mémoire de thèse à ma famille pour leurs encouragements tout au long de ce parcours. Le meilleur pour la fin, ... Mustapha, tu m'as suivie tout au long de ce parcours d'abord en tant qu'ami puis en tant que mari...bientôt papa, un grand merci mon coco.

BIBLIOTHÈQUE
NANCY

TABLE DES MATIERES

VALORISATION DES TRAVAUX iv

LISTE DES ABREVIATIONS, DES FIGURES ET DES TABLEAUX v

INTRODUCTION GENERALE 1

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 4

1 IDENTIFICATION DE L'AGENT PATHOGENE *LEGIONELLA* 6

1.1 LA BACTERIE *LEGIONELLA* 6

1.2 ECOLOGIE 13

1.3 MODES DE CONTAMINATION ET DE TRANSMISSION 26

1.4 PATHOGENICITE 26

2 CARACTERISATION DU DANGER 38

2.1 RELATION DOSE-REPONSE : CONSIDERATIONS GENERALES 38

2.2 FONCTION DOSE-REPONSE : DONNEES DISPONIBLES POUR *LEGIONELLA* 40

2.3 FACTEURS DE SUSCEPTIBILITE DE L'HOTE A *LEGIONELLA* 44

3 CARACTERISATION DES EXPOSITIONS 45

3.1 DETECTION DE *LEGIONELLA* DANS L'ENVIRONNEMENT 46

3.2 NIVEAUX DE CONTAMINATION EN *LEGIONELLA* 57

3.3 SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE ET GESTION DU RISQUE *LEGIONELLA* 61

4 SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DU RISQUE *LEGIONELLA* 62

4.1 LES SYSTEMES DE SURVEILLANCE DU RISQUE *LEGIONELLA* 62

4.2 EPIDEMIOLOGIE DES LEGIONELLOSES DANS LE MONDE 66

2. MATERIEL ET METHODES 71

1 PRESENTATION DE L' ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE 73

1.1 DEFINITION DE L'ETUDE 73

1.2 POPULATION CIBLE : CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION 73

1.3 PROCEDURES DE RECRUTEMENT 74

1.4 DEROULEMENT GENERAL DE L'ETUDE AU SEIN D'UN ETABLISSEMENT 74

2 EVALUATION DE L'ETAT DE SANTE DES PERSONNES AGEES 75

2.1 ANTECEDENTS MEDICAUX 75

2.2 MANIFESTATIONS CLINIQUES AU COURS DU SUIVI 76

3 REALISATION DU DIAGNOSTIC RESEAU 77

3.1 SYSTEMES DE PRODUCTION ET DE DISTRIBUTION D'EAU CHAUDE 77

3.2 MESURES SUR SITES ET RECHERCHE DE DONNEES 81

3.3 BASES REFERENTIELLES A LA DEFINITION DES POINTS CRITIQUES 82

4 DETERMINATION DES POINTS DE PRELEVEMENTS 83

4.1 RESEAU NON BOUCLE EN COLONNES MONTANTES OU DESCENDANTES 83

4.2 RESEAU BOUCLE EN COLONNES MONTANTES 84

4.3 RESEAU BOUCLE AVEC UNE BOUCLE CENTRALE 85

5 COLLECTE DES AEROSOLS 86

5.1 PRELEVEMENTS D'EAUX 86

5.2 PRELEVEMENTS D'AEROSOLS 86

6 DETECTION ENVIRONNEMENTALE DE *LEGIONELLA* 88

6.1 MILIEUX DE CULTURE GELOSES POUR LA RECHERCHE DE *LEGIONELLA* 88

6.2 TEST DE CONFIRMATION DES COLONIES DE *LEGIONELLA* 89

6.3 DENOMBREMENT DE *LEGIONELLA* CULTIVABLES 89

6.4 DENOMBREMENT TOTAL DES BACTERIES APRES MARQUAGE AU DAPI 90
6.5 DENOMBREMENT DE *LEGIONELLA* PAR HYBRIDATION IN SITU (FISH) 91
7 ANALYSES BIOLOGIQUES 93
7.1 RECHERCHE D'ANTIGENES URINAIRES 93
7.2 DOSAGE DES TITRES EN ANTICORPS ANTI-*LEGIONELLA* 93
8 ANALYSES STATISTIQUES 94
8.1 TESTS STATISTIQUES 94
8.2 ANALYSES QUALITATIVES 94
8.3 ANALYSES QUANTITATIVES 95

3. QUALITE DES RESEAUX D'EAU ET CONTAMINATION EN LEGIONELLES DES MAISONS DE RETRAITE.....96

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 97
2 PROTOCOLES 98
2.1 SITES DE PRELEVEMENTS 98
2.2 CARACTERISATION DU RESEAU D'EAU PAR LE DIAGNOSTIC RESEAU 99
2.3 METHODES DE PRELEVEMENT 100
3 RESULTATS 102
3.1 CRITICITE DES RESEAUX D'EAU CHAUDE SANITAIRE 102
3.2 CONTAMINATION DE L'EAU PAR *LEGIONELLA* 104
3.3 RELATIONS ENTRE DIAGNOSTIC RESEAU ET PRESENCE DE *LEGIONELLA* 110
4 DISCUSSION 133
4.1 QUANTIFICATION DE *LEGIONELLA* DANS LES EAUX CHAUDES SANITAIRES 133
4.2 RELATIONS ENTRE DIAGNOSTIC RESEAU ET PRESENCE DE *LEGIONELLA* 133

4. AEROSOLS D'EAU CHAUDE DE DOUCHES ET CONTAMINATION EN LEGIONELLES 135

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 136
2 DETERMINATION ET CHOIX METROLOGIQUE DE COLLECTE DES *LEGIONELLA* AEROPORTEES 138
3 CONTAMINATION DES AEROSOLS PAR *LEGIONELLA* 151
3.1 SITES DE PRELEVEMENTS 151
3.2 CONDITIONS DE PRELEVEMENT DE L'AEROSOL DE DOUCHES 151
3.3 PRESENTATION DES RESULTATS 153
3.4 PARAMETRES PHYSIQUES CARACTERISTIQUES DU PRELEVEMENT 154
4 RELATION ENTRE LA CONTAMINATION DE L'EAU ET DES AEROSOLS DE DOUCHE 155
4.1 RESULTATS DE L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (ACP) 155
4.2 RELATION EXPLICITE ENTRE LES NIVEAUX DE LEGIONELLES DE L'EAU ET DE L'AEROSOL 158
5 DISCUSSION 160
5.1 BIOCOLLECTEURS ET AEROSOLS DE *LEGIONELLA* 160
5.2 QUANTIFICATION DE *LEGIONELLA* DANS LES AEROSOLS AMELIOREE PAR LA METHODE FISH 161
5.3 RELATION ENTRE TENEURS EN *LEGIONELLA* DE L'EAU CHAUDE ET DE L'AEROSOL DE DOUCHE 163

5. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DU RISQUE LIE À *LEGIONELLA*...165

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 166
2 SITES D'ETUDE ET REPARTITION DES VOLONTAIRES 167
2.1 ETABLISSEMENTS RECRUTES 167
2.2 REPARTITION DES VOLONTAIRES AU SEIN DES STRUCTURES ETUDIEES 168
3 CARACTERISATION DE LA POPULATION ETUDIEE 169
3.1 CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA POPULATION D'ETUDE 169
3.2 ETAT IMMUNITAIRE 171
3.3 MANIFESTATIONS CLINIQUES 174
4 RISQUE LIE A L'EXPOSITION A *LEGIONELLA* : FIEVRE DE PONTIAC 175
4.1 DEFINITION OPERATIONNELLE DE LA FIEVRE DE PONTIAC 175
4.2 INCIDENCE DE LA FIEVRE DE PONTIAC 186
5 DISCUSSION 189
5.1 SINGULARITES DE LA RECHERCHE ET DE LA POPULATION ETUDIEE 189
5.2 DEFINITION D'UN CAS DE FIEVRE DE PONTIAC 190
5.3 INCIDENCE DE LA FIEVRE DE PONTIAC CHEZ LES PERSONNES AGEES 191

6. EVALUATION DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC 192

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 194
2 EVALUATION DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC : APPROCHE BIOLOGIQUE 195
2.1 FACTEURS FAVORISANTS 195
2.2 ANALYSE DES MARQUEURS D'EXPOSITION 196
3 CARACTERISATION DE L'EXPOSITION A *LEGIONELLA* 198
3.1 PRESENTATION DES DONNEES 198
3.2 PLAN D'ANALYSE DES DONNEES 199
4 EVALUATION DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC : APPROCHE ENVIRONNEMENTALE 201
4.1 EXPOSITION BASEE SUR LES TENEURS DE *LEGIONELLA* DANS L'EAU 201
4.2 ETABLISSEMENT D'UNE RELATION DOSE-EFFET SUR L'EAU CHAUDE 203
4.3 EXPOSITION AUX AEROSOLS DE *LEGIONELLA* 205
5 DETERMINATION DES FACTEURS DE RISQUE DE LA FIEVRE DE PONTIAC 207
5.1 RAPPEL DES DONNEES 207
5.2 FACTEURS DE RISQUE DE LA FIEVRE DE PONTIAC 207
6 DISCUSSION 209
6.1 FACTEURS DE RISQUE BIOLOGIQUES DE LA FIEVRE DE PONTIAC 209
6.2 SEROPREVALENCE DES ANTICORPS CHEZ LES CAS-FIEVRE DE PONTIAC 210
6.3 LIEN ENTRE EXPOSITION A *LEGIONELLA* ET FIEVRE DE PONTIAC 211

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 214

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 220

ANNEXES A1

VALORISATION DES TRAVAUX

PUBLICATIONS DANS LE CADRE DU DOCTORAT

Tossa P., Deloge-Abarkan M., Zmirou-Navier D., Hartemann P. & Mathieu L. (2006) Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies, *BMC Public Health*, **6**(1), 112.

Mathieu L., Robine E., Deloge-Abarkan M., Ritoux S., Pauly D., Hartemann P. & Zmirou-Navier D. (2006) *Legionella* Bacteria in Aerosols: Sampling and Analytical Approaches Used during the Legionnaires Disease Outbreak in Pas-de-Calais, *J. Infect. Dis.*, **193**(9), 1333-1335.

Deloge-Abarkan M., Ha T.L., Robine E., Zmirou-Navier D. & Mathieu L. (2007) Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent *in situ* hybridization, *acceptée à Journal of Environmental Monitoring.*

Deloge-Abarkan M., Oberti S., Dhome N., Zmirou-Navier D. & Mathieu L. (2006) *Legionella* in hot water systems in french nursing homes : prevalence and factors predisposing, *pour soumission à Water Research.*

PUBLICATION DANS LE CADRE DU DEA

Capizzi-Banas S., Deloge M., Remy M. & Schwartzbrod J. (2004) Liming as an advanced treatment for sludge sanitisation: helminth eggs elimination--Ascaris eggs as model, *Water Res.*, **38**(14-15), 251-3258.

COMMUNICATIONS

Mathieu L., Ha T.L., Deloge-Abarkan M. & Robine E. (2006) Caractérisation de l'exposition aux aérosols de légionelles : aspects métrologiques, *ASFERA*, Décembre 2006.

Mathieu L., Ha T.L., Deloge-Abarkan M. & Robine E. (2006) Caractérisation de l'exposition aux aérosols de légionelles : aspects métrologiques, *Journées Scientifiques de l'AFSSET*, 2-3 Février 2006, Paris.

Ha TL., Deloge-Abarkan M., Mathieu L. & Robine E. (2005) Metrology of *Legionella* aerosols : from laboratory approach to a field evaluation of samplling and detection methods. *6th International Conference on Legionell*a, Chicago, Etats-Unis, 16-20 October.

Deloge M., Robine E., Zmirou-Navier D., Hartemann P. & Mathieu L. (2005) Exposure of elderly people to *Legionella* isoalted in shower hot-water aerosols in nursing homes : first results from the French LEGION'AIR multicentric study. *20th Annual Meeting of the European Working Group for Legionella Infections*, Roma, Italy, 15-17 May.

Deloge M., Diguio N., Tossa P., Zmirou-Navier D., Hartemann P. & Mathieu L. (2005) Seroprevalence of antibodies to *Legionella* among elderly people living in French nursing homes. *20th Annual Meeting of the European Working Group for Legionella Infections*, Roma, Italy, 15-17 May.

Deloge M., Ha TL., Robine E., Zmirou-Navier D., Hartemann P. & Mathieu L. (2004) Aerosols containing *Legionella* measured by fluorescent *in situ* hybridisation : new approaches to metrology. *19th Annual Meeting of the European Working Group for Legionella Infections*, Chamonix Mont Blanc, France, 15-18 May.

Ha TL., Deloge M., Mathieu L., Gehin E. & Robine E. (2004) Design of an experimental chamber to study aerosols of *Legionella. 19th Annual Meeting of the European Working Group for Legionella Infections*, Chamonix Mont Blanc, France, 15-18 May.

Deloge M., Ha TL., Robine E., Zmirou-Navier D., Hartemann P. & Mathieu L. (2004) Aerosols containing *Legionella* measured by fluorescent *in situ* hybridisation : new approaches to metrology. *6th Cannes Water Symposium*, Cannes, France, 28th June – 2nd July.

LISTE DES ABREVIATIONS, DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

ACES	N-[2-acetamido]-2-amino-ethanesultonic acid
ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFNOR	Agence Française de Normalisation
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ANC	Active Non Cultivable
ARN	Acide Ribonucléique
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
Base A	Adénine
Base C	Cytosine
Base G	Guanine
Base T	Thymine
BCYE	Buffer Charcoal Yeast Extract
BMPA	BCYE supplémenté en antibiotiques
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BYE	Buffer Yeast Extract
C.CLIN	Centre de Coordination de la Lutte des Infections Nosocomiales
CAP	Competence and Adherence-associated Pilus
C.D.	Cystéine Dependance
CDC	Center of Disease Control
CDSC	Communicable Disease Surveillance Center
CIC	Centre d'Investigation Clinique
CIRE	Cellule Interrégionale d'Epidémiologie
CLIN	Comité de Lutte Contre les Infections Nosocomiales
CNR	Centre National de Référence des Légionelles
CSHPF	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
CYE	Charcoal Yeast Extract
D.I.	Dose Infectante
$D.L._{50}$	Dose Létale à 50%
DAPI	4',6-diamidino-2 phénylindole
DDASS	Direction Départementale de Affaires Sanitaires et Sociales
DGS	Direction Générale de la Santé
DO	Déclaration Obligatoire
dot	*defective in organelle trafficking*
DRASS	Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales
EDSA	Eau Distillée Stérile Apyrogène
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPA	United States Environnemental Protection Agency
EWGLI	European Working Group for *Legionella* Infection
FISH	Fluorescence *In Situ* Hybridization
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GVPC	Glycine, Vancomycine, Polymixine et Cycloheximide
H.R.	Humidité Relative
I.C.	Intervalle de Confiance

icm	*intracellular multiplication*
IFA	Immunofluorescence Assay
IFD	Immunofluorescence Directe
IFI	Immunofluorescence Indirecte
Ig	Immunoglobuline
InVS	Institut National de Veille Sanitaire
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
JORF	Journal Officiel de la République Française
L. sp.	*Legionella species*
L.D.	Limite de Détection
LBA	Lavage Broncho-alvéolaire
LLAP	*Legionella*-Like Amoebal Pathogen
LPS	Lipopolysaccharide
mip	*macrophage infectivity potentiator*
MOMP	Major Outer Membran Protein
MR	Maison de Retraite
MSP	Major Secretory Protein
N.D.	Non Déterminé
N.R.	Non Référencé
NF	Norme Française
O.A.P.	Open Air Factor
O.M.S.	Organisation Mondiale de la Santé
O.R.	Odd Ratio
OMP	Outer Membran Protein
PBS	Tampon phosphate
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Polyéthylène
PEX	Polyéthylène réticulé
pilD	Prepiline peptidase
PNSE	Plan National Santé Environnement
ppGpp	guanosine-bipyrophosphate
PVC	polychlorure de vinyle
RER	Reticulum Endoplasmique Rugueux
SDS	Sodium dodecylsulfate
SG.	Sérogroupe
TAC	Titre Alcalimétrique Complet
U.V.	Ultra Violet
UFC	Unité Formant Colonie
USA	United States of America
V.I.H.	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNC	Viable Non Cultivable
VPN	Valeur Prédictive Négative
VPP	Valeur Prédictive Positive

LISTE DES FIGURES

1. 1 : Effet de la température de l'eau sur *L. pneumophila* 17
1. 2 : Survie d'un aérosol de *L. pneumophila*..... 22
1. 3 : Cycle de vie de *Legionella*..... 27
1. 4 : Antibiothérapie des légionelloses recommandées par l'AFSSAPS. 38
1. 5 : Tailles des particules d'aérosols..... 47
1. 6 : Principe de la technique d'hybridation *in situ* (FISH) sur une cellule entière..... 55
1. 7: Organisation de la surveillance et de la collecte des données des cas de légionelloses en France..... 64
1. 8 : Pays et centres de collaboration EWGLI en 2004..... 65
1. 9 : Illustration des différents types épidémiologiques..... 67
1. 10 : Evolution du nombre de cas de légionelloses déclarés aux Etats-Unis entre 1984 et 1996. 70
1. 11 : Evolution du nombre de cas de légionelloses déclarés en Europe entre 1993 et 1999..... 71
1. 12 : Evolution du nombre de cas de légionelloses déclarés en France depuis 1988 72

2. 1 : Schéma de deux types de réseau d'eau chaude – A : réseau non bouclé ; B : réseau bouclé..... 79
2. 2 : Exemple d'organisation du réseau et de localisation des points de douches utilisés par les volontaires de l'étude sur un réseau non bouclé en colonnes montantes[7]. 83
2. 3 : Exemple d'organisation du réseau et de localisation des points de douches utilisés par les volontaires de l'étude sur un réseau bouclé - A : en colonnes montantes[7] ; B : en parapluie. 84
2. 4 : Exemple d'organisation du réseau et de localisation des points de douches utilisés par les volontaires de l'étude sur un réseau bouclé avec une boucle centrale. 85

3. 1 : Cartographie des sites de prélèvements dans la région lorraine..... 99
3. 2 : Criticité des réseaux d'eau des 34 maisons de retraite de Lorraine établi sur la base du diagnostic réseau développé par la société Dalkia. 103
3. 3 : Classes de contamination des eaux chaudes en *Legionella* – A : détectées par culture (n=676); B : détectées par hybridation *in situ* (n=676). 105
3. 4 : Concentration de *Legionella* dans les eaux du 1er jet en fonction de la concentration de *Legionella* dans les eaux de purge – A : détectées par culture (n=53); B : détectées par hybridation *in situ* (n=122)..... 106
3. 5 : Fréquence de répartition des delta (différence de concentrations en *Legionella*) entre les eaux du 1er jet (n=338) et les eaux purge (n=338). 106
3.6. : Evolution temporelle des concentrations en *Legionella* et bactéries totales dans les eaux purge de trois douches d'une maison de retraite (n=21) – A : près de la production d'eau chaude ; B : sur le réseau d'eau chaude ; C : le plus éloigné de la production d'eau chaude. 109

4. 1 : Mise en scène et positionnement des biocollecteurs lors des échantillonnages d'aérosols de douche..... 152
4. 2 : Classes de concentrations en *Legionella*, détectée par hybridation *in situ*, dans les aérosols de douche, collectés par impaction en milieu liquide (n=164). 154
4. 3 : Cercle des corrélations des huit variables mesurées 156
4. 4 : Concentrations de *Legionella* détectées par la technique d'hybridation *in situ* dans les eaux chaudes et les aérosols de douche mesurés au même point de prélèvement (n=164). 159

5. 1 : Répartition départementale des établissements de santé et des effectifs des volontaire 168
5. 2 : Répartition des effectifs moyens des volontaires..... 169
5. 3 : Fréquence des principaux antécédents respiratoires chez les personnes âgées des 34 maisons de retraite... 171
5. 4 : Fréquence des principaux antécédents immunitaires chez les personnes âgées (n=828) 171
5. 5 : Prévalence des anticorps anti-*Legionella* en fonction des titres des sérums (n=671) 173
5. 6 : Courbe épidémique des 4 cas groupés de fièvre de Pontiac diagnostiqués dans une maison de retraite. 189

6. 1 : Prévalencedes titres d'anticorps au niveau des cas de fièvre de Pontiac et de la population âgée totale (n=828)..... 197
6. 2 : Niveaux d'exposition des personnes âgées à *Legionella* : présentation des données 198

LISTE DES TABLEAUX

1. 1: Espèces et sérogroupes du genre *Legionella*[a] [Fields et al., 2002] ... 8
1. 2 : Cibles moléculaires d'une bactérie aéroportée soumise aux stress du milieu aérien [Cox, 1989]. ... 20
1. 3 : Manifestations cliniques des légionelloses [Jarraud et al., 2000] ... 32
1. 4 : Signes cliniques développés durant des épisodes de fièvre de Pontiac. ... 33
1. 5: Evaluation des méthodes de diagnostic biologique de la maladie du Légionnaire [Jarraud et al., 2000]. ... 34
1. 6 : Répartition des cas de maladie du Légionnaire selon les méthodes de diagnostic. ... 35
1. 7 : Modèles mathématiques utilisés dans les relations dose-réponse. ... 40
1. 8 : Symptômes diagnostiqués chez des cobayes en fonction de la dose d'inhalation en *Legionella*. ... 42
1. 9 : Létalité observée chez des animaux auxquels *Legionella* a été administrée. ... 42
1. 10 : Sondes oligonucléotidiques utilisées pour la détection de *Legionella* par hybridation. ... 56
1. 11 : Concentrations de *Legionella* retrouvées dans les ressources naturelles en eau. ... 58
1. 12 : Concentrations en légionelles mesurées dans l'air par différentes techniques d'analyses. ... 60
1. 13 : Mesures de gestion en cas de contamination par *L. pneumophila* d'un réseau d'eau chaude d'un établissement de santé [CSHPF, 2005] ... 61
1. 14 : Mesures de gestion en cas de contamination par *Legionella* de l'eau d'une tour aéroréfrigérante ... 62
1. 15: Epidémies de fièvre de Pontiac en Amérique du Nord. ... 68
1. 16: Epidémies de fièvre de Pontiac en Europe. ... 69
1. 17: Expositions à risque parmi les cas de légionellose survenus en France entre 2001 et 2004. ... 73

2. 1 : Conditions opératoires pour le prélèvement des aérosols microbiologiques ... 87
2. 2 : Composition des suppléments nécessaires à la croissance de *Legionella* (SR110C et SR152E pour 1 litre d'eau distillée). ... 88
2. 3 : Composition du supplément spécifique à la non cultivabilité de *Legionella* (SR175A). ... 89

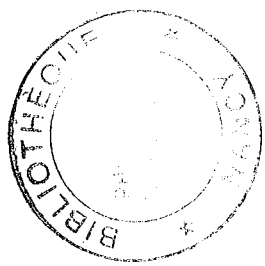
3. 1 : Caractéristiques microbiologiques moyennes des eaux chaudes des réseaux d'eau chaude de 34 maisons de retraite de Lorraine. ... 104

4. 1: Données de littérature relatives aux concentrations en *Legionella* mesurées dans l'air et dans l'eau ... 137
4. 2 : Caractéristiques microbiologiques de l'aérosol généré lors des douches dans les maisons de retraite ... 153
4. 3 : Cractéristiques physiques des ambiances de prélèvements des aérosols d'eaux chaudes gébérés lors des douches (n=164) ... 155
4. 4 : Coefficients de détermination entre les huit variables et les 2 axes principauc choisis. ... 153
4. 5 : Matrice de corrélation entre la concentartion de *Legionella* mesurées dans l'eau chaude et dans l'aérosol de douches (culture et FISH) et les paramètres ambiants spécifiques de la pièce ... 157
4. 6 : Présence et absence de *Legionella* détectées par l'hybridation *in situ* dans les eaux chaudes et les aérosols de douche ... 159
4. 7 : Risque de présence de *Legionella* détectées par hybridation *in situ* dans les aérosols de douche, en fonctiondes concentrations de *Legionella* hybridées dans l'eau chaude ... 160

5. 1 : Description de la population de personnes âgées volontaires (n=828). ... 170
5. 2 : Fréquence des antécédents relevés chez les personnes âgées (n=828). ... 170
5. 3 : Prévalence des titres maximum d'anticorps anti-*Legionella* chez les personnes âgées (n=671). ... 173
5. 4 : Signes cliniques présentés par les personnes âgées au cours de l'étude (n=828). ... 174
5. 5 : Exposition à *Legionella* des personnes âgées répondant à la définition clinique de fièvre de Pontiac ... 186
5. 6 : Signes cliniques observés chez les 29 cas de fièvre de Pontiac au cours des épisodes. ... 187
5. 7 : Prévalence des titres d'anticorps, toute espèce de *Legionella* confondue chez 23 cas cliniques de fièvre de Pontiac. ... 188

6. 1 : Risque de développer la fièvre de Pontiac en fonction de l'état de santé (n=828). ... 196
6. 2 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des titres en anticorps (n=828). ... 198
6. 3 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction de la concentration de *Legionella* cultivables dans l'eau et des hypothèses d'exposition. ... 202
6. 4 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction de la concentration de *Legionella* mesurée par la technique FISH dans l'eau et des hypothèses d'exposition. ... 203
6. 5 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des classes de concentration en *Legionella* cultivables dans l'eau. 204
6. 6 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des classes de concentration en *Legionella* détectée par la technique FISH dans l'eau. ... 205

6. 7 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction de la concentration de *Legionella* mesurée par la technique FISH sur les échantillons d'air collectés par impaction liquide. 206
6. 8 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction de la concentration de *Legionella* mesurée par la technique FISH sur les échantillons d'air collectés par impaction liquide. 207
6. 9 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des facteurs favorisants 208



INTRODUCTION GENERALE

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
NANCY

La gestion du risque lié à *Legionella* est une préoccupation importante des autorités sanitaires et la réduction de ce risque est inscrite au rang des priorités dans la loi relative à la politique de santé publique de 2004 [JORF, 2004]. Deux pathologies sont associées à cette bactérie [Jarraud *et al.*, 2000] : la maladie du Légionnaire, pneumopathie sévère, et la fièvre de Pontiac, syndrome pseudo-grippal encore mal connu. Aujourd'hui, les épidémies de la maladie du Légionnaire ne cessent d'augmenter malgré les mesures prises en terme de surveillance et de sensibilisation sanitaire [Joseph, 2004], tandis que les épidémies de fièvre de Pontiac sont sûrement sous-estimées du fait de la symptomatologie non définie de manière consensuelle.

De nombreux travaux menés depuis la découverte en 1976 de la bactérie *Legionella* ont montré que l'environnement aquatique naturel et artificiel était son réservoir [Nhu Nguyen *et al.*, 2006 ; Leoni *et al.*, 2005 ; Perola *et al.*, 2005 ; Fields *et al.*, 2002 ; Steinert *et al.*, 2002]. Les investigations dans ce domaine ont permis de quantifier sa prévalence et de préciser les conditions favorables à sa multiplication, notamment une température comprise entre 20 et 45° C [Habicht et Muller, 1988 ; Wadowsky *et al.*, 1985 ; Fliermans *et al.*, 1981], certaines caractéristiques physico-chimiques [Borella *et al.*, 2005], et la stagnation de l'eau [Ciesielski *et al.*, 1984]. Les autorités sanitaires, dans un souci de prévention, ont établi des valeurs seuils de *Legionella* dans l'eau et un référentiel indiquant les facteurs de risque à la prolifération bactérienne [DGS, 2002]. Malgré ces mesures, le risque demeure d'actualité.

En effet, le mode de propagation et la voie de contamination de la bactérie, c'est-à-dire l'aérosol [Fields *et al.*, 2002], ne sont pas encore pris en considération dans la gestion de ce risque bactérien. Pourtant, l'urbanisation et les progrès technologiques ont offert à cette bactérie la possibilité de se développer largement dans des installations techniques (tours aéroréfrigérantes, pommeaux de douche, systèmes de climatisation) et d'être diffusée sous forme d'aérosols, puis inhalée. Or, à ce jour, il n'existe pas de

relation connue entre les teneurs en légionelles dans l'eau et dans l'aérosol. La fonction de transfert entre l'eau, contaminée en *Legionella*, et l'air est encore inconnue même si de rares travaux ont tenté d'évaluer le niveau de contamination de l'aérosol [Ishimatsu *et al.*, 2001 ; Breiman *et al.*, 1990a et b ; Bollin *et al.*, 1985 ; Dennis *et al.*, 1984]. La gestion de ce risque biologique est donc limitée par des aspects métrologiques - mesure et détection de *Legionella* dans les aérosols - et *à fortiori* par la méconnaissance de la dose infectante et l'absence de relation dose-effet établie pour l'Homme.

Dans ce contexte, ce travail de recherche concerne l'exposition à la bactérie *Legionella* présente dans des aérosols d'eaux chaudes contaminées, et vise à quantifier le risque d'infection à légionelles dans une population sensible. Il s'intéresse à la forme bénigne de l'infection à *Legionella*, la fièvre de Pontiac. Les modèles d'exposition choisis sont les personnes âgées vivant en maisons de retraite dans la région lorraine ; et la voie d'exposition est l'aérosol généré lors de la prise de douche.

Cette recherche associe des aspects de biologie environnementale et des aspects épidémiologiques. Elle met en œuvre des outils innovants de caractérisation des expositions, à la fois en termes de collecte d'aérosol (différents principes de prélèvement des bioaérosols, banc d'aérosolisation) et de mesure des légionelles aérosolisées (méthodes conventionnelles et moléculaires).
L'exposition des personnes âgées a été prise en compte à la fois à partir de données écologiques (concentrations de *Legionella* dans l'eau et dans l'air) et de caractéristiques individuelles (fréquence de la prise de douche, âge, sexe, tabagisme, antécédents médicaux, ...).

L'objectif principal est d'établir une relation entre les niveaux de contamination en légionelles dans l'eau et les aérosols de douches et l'incidence de la fièvre de Pontiac dans la population exposée. Il met notamment l'accent sur (i) une meilleure connaissance de la colonisation de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude ; (ii) une caractérisation de la voie d'exposition à la bactérie, l'aérosol ; (iii) l'appréciation des risques sanitaires encourus par les populations exposées.

L'analyse bibliographique constitue le chapitre 1 de ce mémoire ; elle fait la synthèse des connaissances actuelles sur la bactérie pathogène *Legionella*. Pour se faire, nous nous sommes inspirés de la démarche classique de l'évaluation du risque. Ainsi, trois phases sont développées : (i) l'identification de la bactérie ; (ii) la caractérisation du danger de cet agent et (iii) des expositions à *Legionella* ; ainsi que la surveillance épidémiologique mise en place pour cette bactérie.

Le chapitre 2 détaille le matériel et les méthodes employées durant ce travail : (i) présentation de l'étude épidémiologique ; (ii) réalisation du diagnostic réseau afin d'identifier les différents points critiques au sein des établissements en terme de *Legionella* ainsi que les points de prélèvements d'eau et d'aérosols ; (iii) analyse des échantillons environnementaux (eau et aérosols) et biologiques (sang et urine) à la recherche de *Legionella* et ; (iv) présentation des outils statistiques utilisés.

Le chapitre 3 est consacré à l'occurrence de *Legionella* dans les eaux chaudes des douches d'une trentaine de maisons de retraite de la région Lorraine. La cartographie de la contamination des réseaux d'eau chaude par *Legionella* qui en découle est mise en relation avec les résultats d'une analyse des points critiques répertoriés sur chaque réseau d'eau chaude.

Le chapitre 4 présente la contamination en *Legionella* des aérosols d'eau chaude, mesurée aux points de douches des maisons de retraite. Cette contamination des aérosols par *Legionella* est mise en relation avec la contamination des eaux en *Legionella*, toutes deux mesurées au même point, ainsi qu'avec les paramètres physiques spécifiques à chaque ambiance de prélèvement.

Le chapitre 5 concerne l'infection à *Legionella* lors de l'exposition des personnes âgées aux aérosols contaminés d'eaux chaudes générés lors de douches. L'étude épidémiologique permet de mesurer l'incidence de la fièvre de Pontiac dans un contexte non épidémique.

Le chapitre 6 identifie et quantifie les facteurs de risque de la fièvre de Pontiac chez les personnes âgées afin de disposer d'un modèle de prédiction du risque de la fièvre de Pontiac dans ce contexte. La finalité est d'apporter des éléments de réponse quant au risque légionelles en établissant des liens entre les niveaux de légionelles dans l'eau et dans les aérosols et l'incidence de la fièvre de Pontiac.

En conclusion, un bilan de l'ensemble des résultats acquis est proposé ainsi que des perspectives pour des travaux ultérieurs.

1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire

1 IDENTIFICATION DE L'AGENT PATHOGENE *LEGIONELLA* 6
1.1 LA BACTÉRIE *LEGIONELLA* 6
1.1.1 Historique 6
1.1.2 Taxonomie 7
1.1.3 Description de *Legionella* 9
1.2 ECOLOGIE 13
1.2.1 Réservoirs de la bactérie *Legionella* 13
1.2.2 Devenir de *Legionella* dans l'environnement 16
1.2.3 Relations de *Legionella* avec les protozoaires et procaryotes 23
1.3 MODES DE CONTAMINATION ET DE TRANSMISSION 26
1.4 PATHOGENICITE 26
1.4.1 Cellules hôtes 26
1.4.2 Facteurs de virulence et mécanisme de pathogénicité 28
1.4.3 Manifestations cliniques des formes de légionellose 31
1.4.4 Diagnostic de la maladie du Légionnaire 33
1.4.5 Traitement de la maladie du Légionnaire 37
2 CARACTERISATION DU DANGER 38
2.1 RELATION DOSE-REPONSE : CONSIDERATIONS GENERALES 38
2.1.1 Présentation et définition 38
2.1.2 Modèles mécanistiques ou modèles sans seuil 39
2.1.3 Incertitudes liées aux modèles de relation dose-effet 40
2.2 FONCTION DOSE-REPONSE : DONNEES DISPONIBLES POUR *LEGIONELLA* 40
2.2.1 Dose Infectieuse 41
2.2.2 Dose Létale 42
2.2.3 Projection des risques pour l'Homme 43
2.3 FACTEURS DE SUSCEPTIBILITE DE L'HOTE A *LEGIONELLA* 44
2.3.1 Facteurs de risque de la maladie du Légionnaire 44
2.3.2 Facteurs de risque de la fièvre de Pontiac 45

3 CARACTERISATION DES EXPOSITIONS 45
3.1 DETECTION DE LEGIONELLA DANS L'ENVIRONNEMENT 46
3.1.1 Collecte des bioaérosols 46
3.1.2 Méthodes d'analyse et d'identification de *Legionella* 50
3.2 NIVEAUX DE CONTAMINATION EN *LEGIONELLA* 57
3.2.1 Dans le milieu hydrique 57
3.2.2 Dans le milieu aérien 60
3.3 SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE ET GESTION DU RISQUE *LEGIONELLA* 61
4 SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DU RISQUE *LEGIONELLA* 62
4.1 LES SYSTEMES DE SURVEILLANCE DU RISQUE *LEGIONELLA* 62
4.1.1 Surveillance du risque *Legionella* en France 63
4.1.2 Surveillance du risque *Legionella* en Europe 65
4.1.3 Surveillance du risque *Legionella* dans le monde 66
4.2 EPIDEMIOLOGIE DES LEGIONELLOSES DANS LE MONDE 66
4.2.1 Formes épidémiologiques 66
4.2.2 Epidémies de fièvre de Pontiac 67
4.2.3 Epidémies de la maladie du Légionnaire 69

L'objectif de ce premier chapitre est de présenter l'état de l'art des connaissances sur la bactérie pathogène *Legionella*. Pour se faire, nous avons adopté la démarche d'une évaluation du risque pour cette bactérie afin de définir son impact potentiel sur la santé humaine. Ainsi, trois phases de l'évaluation du risque seront développées : identification de la bactérie, caractérisation du danger et caractérisation des expositions à cet agent *Legionella*. Enfin, la dernière partie de ce chapitre sera consacrée à la surveillance épidémiologique mondiale mise en place pour cette bactérie.

1 IDENTIFICATION DE L'AGENT PATHOGENE *LEGIONELLA*

Il s'agit de présenter la bactérie *Legionella*, un agent d'intérêt sanitaire, avec ses caractéristiques et ses effets indésirables sur la population. En outre, les circonstances au cours desquelles ce danger bactérien peut s'exprimer seront aussi développées.

1.1 LA BACTERIE *LEGIONELLA*

1.1.1 Historique

Les circonstances de la découverte de *Legionella* sont aujourd'hui bien connues. L'étude de la bactérie appartenant au genre *Legionella*, a débuté suite au 58ème congrès de « l'American Legion » (anciens combattants) en été 1976, à l'hôtel Bellevue-Stratford (Philadelphie, USA). Lors de cet évènement, qui rassemblait 4400 participants, 182 cas de pneumopathies aiguës fébriles ont été décelés, dont 29 mortels [Fraser *et al.*, 1977].

La longue enquête épidémiologique qui suivit, montra que l'incidence de la maladie chez les légionnaires était directement proportionnelle au temps passé dans l'hôtel. Aucune transmission par la nourriture ou de type inter humaine n'a pu être démontrée. L'hypothèse de la contamination par voie aérienne fut alors été rapidement évoquée, incriminant le système de climatisation de l'hôtel [Fraser *et al.*, 1977].

L'agent responsable de la maladie du Légionnaire, la bactérie LDB (Legionnaires' Disease Bacterium), fut isolé en janvier 1977 par McDade *et al.* [1977].

Par la suite, des enquêtes sérologiques rétrospectives permirent de rattacher à la maladie du Légionnaire plusieurs épidémies de pneumopathies aiguës jusqu'alors inexpliquées depuis 1968 à Pontiac (USA). Cette maladie n'était donc pas nouvelle. La bactérie avait même été isolée dès 1943 par Tatlock [Tatlock, 1944] sous l'appellation « *Rickettsia-like* ». En 1979, le nom de *Legionella pneumophila (L. pneumophila)* fut donné à cette bactérie qui était alors le seul représentant d'une nouvelle famille, *Legionellaceae* [Brenner *et al.*, 1979]. La description de cette famille ne reposait alors quasiment que sur des caractères phénotypiques.

1.1.2 Taxonomie

1.1.2.1 Famille *Legionellaceae* et place phylogénétique

La famille *Legionellaceae*, dont la définition n'a pas subi de modification depuis 1979, se situe au sein de la sous division γ-2 des *Proteobacteria* [Fields *et al.*, 2002 ; Benson et Fields, 1998]. Cette famille s'individualise au niveau des *Eubacteria* et ne comporte actuellement qu'un seul genre : *Legionella* [Fields *et al.*, 2002]. Deux autres genres avaient été proposés [Garrity *et al.*, 1980]:

- *Fluoribacter*, dont les bactéries émettent une autofluorescence bleue lorsqu'elles sont soumises à une lumière U.V. de 365 nm. Sous microscope, les colonies apparaissent avec une surface claire, scintillante et un intérieur opaque en débris de verre.
- *Tatlockia*, dont les colonies se distinguent par une coloration bleu foncée.

Mais les travaux de Fields *et al.* [2002] portant sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S confirment que la famille *Legionellaceae* ne comprend qu'un seul phylum : *Legionella.* Ainsi, *Legionella bozemanii* est synonyme de *Fluoribacter bozemanii*, *L. gormanii*, *L. maceachernii* et *L. micdadei* sont synonymes respectivement de *F. gormanii*, *Tatlockia maceachernii* et *T. micdadei.*

1.1.2.2 Genre *Legionella* : différentes espèces et sous espèces

Le nombre d'espèces et de sérogroupes appartenant au genre *Legionella* ne cesse d'augmenter depuis 1977. Il existe actuellement 48 espèces et 70 sérogroupes (SGs) [Fields *et al.*, 2002]. La plupart des espèces sont associées à une pathologie (maladie du Légionnaire et/ou fièvre de Pontiac), mais quelques-unes n'ont été isolées qu'à partir de prélèvements environnementaux (Tableau 1.1). Il y a 15 SGs identifiés pour *L. pneumophila*, 2 SGs pour les espèces *L. bozemanii, L. longbeachae, L. hackeliae, L. feeleii, L. sainthelensi, L. erythra* et *L. quinlivanii*, et un seul SG n'a été identifié pour les autres espèces de *Legionella.*

Tableau 1. 1: Espèces et sérogroupes du genre Legionella[a] [Fields *et al.*, 2002].

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

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

La connaissance de la diversité génétique au sein d'un même SG et des variations phénotypiques au sein de souches génétiquement homogènes a conduit Brenner *et al.* [1988] à subdiviser l'espèce *L. pneumophila* en trois sous-espèces qui sont :

- *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* regroupant la souche type Philadelphia-1 et des souches des SGs 1 à 14 ;
- *L. pneumophila* subsp. *fraseri* regroupant la souche Los Angeles-1 (souche type du SG 4) et des souches de SGs 1, 4, 5 et Lansing-3 ;
- *L. pneumophila* subsp. *pascullei* regroupant les souches du SG 5 dont la souche type est U8W [Jarraud *et al.*, 2000].

Parmi les 48 espèces de *Legionella* il existe des espèces, à développement intracellulaire obligatoire, qui sont incapables à l'heure actuelle de cultiver sur des milieux de culture spécifiques. Elles sont nommées « *Legionella*-Like Amoebal Pathogens » (LLAPs) grâce à leur capacité à infecter et à se multiplier intracellulairement au sein des amibes [Rowbotham, 1983 ; Rowbotham, 1980]. Ces espèces de légionelles sont isolées par coculture avec leurs protozoaires hôtes et sont capables d'infecter des protozoaires ou des cellules humaines.

Ces LLAPs ne forment pas un groupe phylogénétiquement distinct et unique au sein du genre *Legionella* et elles sont distribuées dans tout le genre *Legionella* [Birtles *et al.*, 1996]. Chaque espèce de LLAP est suivie d'un nombre défini [Adeleke *et al.*, 1996]. Il existe 12 espèces de LLAPs identifiées et regroupées en 5 espèces de *Legionella* [Greub et Raoult, 2004 ; La Scola *et al.*, 2004 ; Adeleke *et al.*, 2001 ; Adeleke *et al.*, 1996 ; Birtles *et al.*, 1996] :

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

Toutes ces espèces ont été isolées de sites reliés à des épidémies de maladies du légionnaire, à l'exception de *L. lytica*, LLAP-1, LLAP-3 et LLAP-5. En effet, ces quatre espèces de *Legionella* ont été isolées soit du sol (*L. lytica*) soit d'échantillons d'eau (LLAP-1et LLAP-5) soit d'un crachat de patient (LLAP-3) [Lo Presti, 1998 ; Fry *et al.*, 1991].

1.1.3 Description de *Legionella*

1.1.3.1 Morphologie

Legionella est une bactérie Gram négatif de forme bacillaire de 0,3 à 0,9 µm de large et de 2 à 20 µm de long [Hookey *et al.*, 1996 ; Winn, 1988 ; Chandler *et al.*, 1979 ; Rodgers *et al.*, 1978 ; McDade *et al.*, 1977 ; Benson et Fields, 1998].

Legionella est non capsulée, non sporulée et non acido-résistante (à l'exception, parfois, de *L. micdadei* dans les tissus infectés) [Winn, 1988].

A l'exception de trois espèces sans motilité (*L. oakridgensis*, *L. natarum* et *L. londiniensis*), les légionelles sont motiles par la présence d'un ou plusieurs flagelles (occasionnellement une paire) pouvant atteindre 8 µm de long et d'environ 14 à 25 nm de diamètre [Winn, 1988 ; Rodgers *et al.*, 1980 ; Chandler *et al.*, 1980a et b]. Ces flagelles sont surtout en position polaire ou sous-polaire [Rodgers *et al.*, 1979 ; Thomason *et al.*, 1979] et sont attachés à la paroi cellulaire par un corps basal formant un crochet comme pour les autres bactéries à Gram négatif et permettraient à *Legionella* d'avoir une motilité lente par glissement [Thomason *et al.*, 1979].

Des fimbriae ou pilis sont distribués sur toute la surface des bactéries [Winn, 1988 ; Rodgers *et al.*, 1979 ; Rodgers *et al.*, 1980].

1.1.3.2 Caractéristiques culturales

Legionella a besoin de conditions particulières pour croître sur des milieux de culture de laboratoire, car elle est incapable de se développer sur des milieux de culture bactériologiques classiques. *Legionella* est une bactérie aérobie stricte se développant sur un milieu de culture à pH légèrement acide (pH=6,9, avec une tolérance jusqu'à des pH=5,5). Ces bactéries sont chimio-organotrophes et utilisent des acides aminés (arginine, acide L-glutamique) comme source d'énergie et de carbone. Ainsi, la croissance est favorisée en atmosphère enrichie en CO_2 (2,5%) et est optimale à 35°C. Les milieux de culture, du fait des exigences de croissance de *Legionella*, doivent être enrichis en fer et en L-cystéine car elle est déficiente en cet acide aminé [Fields *et al.*, 2002 ; Bornstein et Fleurette, 1992].

Le milieu de culture spécifique à *Legionella* conventionnellement utilisé par les bactériologistes est la gélose BCYEα (Buffered Charcoal Yeast Extract α-ketoglutarate), contenant du charbon (détoxifiant, absorbant les acides gras inhibiteurs) [Feeley *et al.*, 1979], un tampon acide (pH=6,9), de la L-cystéine et du pyrophosphate ferrique, comme éléments spécifiques de la croissance. Après de 3 à 7 jours de croissance sur milieu gélosé, les colonies obtenues sont généralement gris-bleu clair mais peuvent être jaune, verte, blanche, marron, violette ou rose [AFNOR, 2003]. Selon la définition consensuelle standard, *Legionella* se caractérise par son polymorphisme et son aspect dit en « verre brisé » à la loupe binoculaire.

Les caractères inhabituels de *Legionella* (coloration, exigences métaboliques en fer et L-cystéine) expliquent la difficulté de sa cultivabilité sur des milieux classiques des bactériologistes et permettent de mieux comprendre son identification tardive de 1977.

1.1.3.3 Caractéristiques biochimiques et enzymatiques

1.1.3.3.1 Caractères métaboliques et enzymatiques

Toutes les *Legionella* sont uréase-négatives et non fermentatives. Toutes (sauf *L. worsleiensis*) sont catalase-positives. L'oxydase est le plus souvent négative sauf pour *L. anisa*. *L. pneumophila* se distingue de la majorité des autres espèces de légionelles par sa capacité à hydrolyser l'hippurate (seules *L. feelei 1*, *L. geestiana*, *L. waltersii* et quelques souches de *L. londoniensis* ont aussi cette capacité) [Hébert, 1981 ; Benson et Fields, 1998]. Ce test peut être utilisé comme critère présomptif pour distinguer quelques espèces de *Legionella* des autres.

1.1.3.3.2 Caractères antigéniques

La structure antigénique de *Legionella* a surtout été étudiée pour l'espèce *L. pneumophila* car elle est la plus fréquemment responsable de légionellose. L'activité antigénique de *Legionella* est liée à des protéines sécrétées et à des antigènes de la membrane externe.

- La principale protéine sécrétée est la « Major Secretory Protein » (MSP), protéase de 39 kDa. Ses propriétés antigéniques ont été démontrées par des essais précliniques de vaccination [Blander et Horwitz, 1991a et b ; Blander et Horwitz, 1989] : en injectant cette protéine par voie sous-cutanée, une hypersensibilité retardée (érythème et induration) s'est développée ainsi qu'une protection immunitaire contre les doses létales d'aérosol contaminé en *Legionella*. Une vaccination à MSP peut induire une protection immunitaire à quelques espèces de *Legionella* et *L. pneumophila* [Blander et Horwitz, 1991].
- Les antigènes membranaires sont :
  - Les lipopolysaccharides (LPS), situés à la surface de la bactérie [Elliott *et al.*, 1981] sont parmi les composants les plus importants de la membrane externe. Ils sont composés de sucres [Fox, 1990], d'une forte teneur en acides gras ramifiés, de peu d'acides gras hydroxylés. La structure des LPS varie selon les espèces et même selon la souche de *Legionella*, ainsi ils sont spécifiques et caractéristiques de chaque SG de l'espèce [Ciesielski *et al.*, 1986 ; Otten *et al.*, 1986].

Ce LPS joue le rôle d'une endotoxine lors des infections [Winn, 1988 ; Johnson *et al.*, 1979]. L'activité antigénique a été découverte par des sérums de patients infectés par *Legionella* pour lesquels la plus grande partie des anticorps développés était dirigée contre ce LPS [Hindhal et Iglewski, 1986 ; Gabay et Horwitz, 1985].

Les LPS sont constitués de trois parties [Neidhardt *et al.*, 1994 ; Cielsielski *et al.*, 1986] :

- Un lipide, appelé lipide A, ancre le LPS dans la membrane externe et est responsable des activités endotoxiques [Leclerc *et al.*, 1995],
- Une courte série de sucres oligosaccharidiques constituant la partie centrale,

- Une longue chaîne glucidique, dont la longueur atteint 40 sucres, constitue l'antigène O. Les chaînes glucidiques hydrophiles de l'antigène O se trouvent à la surface de la bactérie. Les LPS constituent donc le support de l'activité antigénique.

➢ La protéine « Major Outer Membran Protein » (MOMP) [Hindahl et Iglewski, 1984] comme son nom l'indique, est la protéine majeure de la membrane externe [Engleberg *et al.*, 1986 ; Gabay et Horwitz, 1985]. Cette protéine MOMP, pour *Legionella*, a un poids moléculaire de 24 kDa à 33 kDa selon les études [Butler *et al.*, 1985 ; Gabay et Horwitz, 1985 ; Hindahl et Iglewski, 1986 ; Nolte et Conlin, 1986]. Elle est un canal perméable aux ions quatre fois plus sélectif pour les cations que pour les anions [Gabay *et al.*, 1985]. De plus, cette protéine serait une porine car Gabay *et al.* [1985] ont démontré qu'elle a des propriétés similaires à celles des porines d'*E. coli*. Cette protéine est immunogénique [Engleberg *et al.*, 1986] et est nécessaire pour infecter son hôte. Sans cette protéine, la bactérie perd la faculté d'infecter une cellule semblable aux macrophages humains, tout en gardant la possibilité de multiplication intracellulaire [Cianciotto *et al.*, 1989].

1.1.3.4 Composition en acides gras cellulaires

La composition en acides gras ramifiés cellulaires que possède *Legionella* est un des éléments les plus caractéristiques de cet organisme. En effet, 40 à 90 % des acides gras des *Legionella* sont ramifiés [Lambert et Moss, 1989]. Or les acides gras ramifiés, fréquents chez les bacilles à Gram positif, sont rarement rencontrés chez les bacilles à Gram négatif et toujours en très faible quantité [Marmet et *al.*, 1988 ; Garrigues et Véron, 1987]. Chaque espèce comporte en théorie une composition spécifique en divers acides gras, autant en quantité qu'en qualité : ce critère a donc été utilisé pour classer les *Legionella* en groupe d'espèces [Moss *et al.*, 1981 ; Moss et Dees, 1979]. En effet, le genre *Legionella* se caractérise par la présence des acides gras ramifiés i-14:0*, 12-méthyl tétradécanoïque (a-15:0), 14-méthyl pentadécanoïque (i-16:0), hexadécanoïque (i-16:1), et méthyl hexadécanoïque (a-17:0). L'absence ou la présence en très faible quantité (< 0,5% à 5% selon les espèces de *Legionella*) d'hydroxyacides est également remarquable [Lambert et Moss, 1989 ; Finnerty *et al.*, 1979].

1.1.3.5 Composition de la paroi

La paroi de *Legionella*, comparable à celle des autres bactéries Gram négatif [Flesher *et al.*, 1979], présente cependant des caractéristiques spécifiques au niveau du peptidoglycane et des ubiquinones :

- Le peptidoglycane de *L. pneumophila* est principalement composé d'acide muramique, de glucosamine, d'acide glutamique, d'alanine, et d'acide *meso*-diaminopimélique.

* Position du radical méthyl (a : anté-iso ; i : iso) - nombre d'atomes de carbone : nombre de doubles liaisons

- Une étude a montré que 80 à 90% des résidus aminés de l'acide diaminopimélique sont liés ce qui confère au peptidoglycane de *Legionella* une plus grande résistance physique [Amano et Williams, 1983].

- Les ubiquinones (coenzyme Q, enzymes spécifiques de l'activité respiratoire) de la membrane cytoplasmique jouent un rôle important dans le transport d'électrons [Leclerc *et al.*, 1995]. Elles sont composées d'un noyau benzoquinone et d'une chaîne latérale comportant habituellement 7 à 10 unités isoprèniques. Les *Legionella* possèdent des ubiquinones à longues chaînes latérales de 10 à 14 unités et en mélanges complexes [Lambert et Moss, 1989 ; Marmet et *al.*, 1988] ce qui pourrait être utilisé pour les différencier d'autres bactéries.

1.1.3.6 Composition en sucres de la bactérie

La composition en sucres de *Legionella* a été suggérée au début des années 90 comme une analyse chemotaxonomique permettant de différencier les espèces de *Legionella* [Fox *et al.*, 1990]. Toutes les *Legionella* possèdent du ribose, mannose, glucose, de l'acide muramique, et de la glucosamine. Pourtant elles ne contiennent pas d'heptose, qui est généralement retrouvé dans le LPS des bactéries à Gram négatif. Certaines espèces possèdent de la quinovosamine (à l'exception de *L. gormanii*, *L. micddadei* et *L. maceachernii*) et de la fucosamine (à l'exception de *L. gormanii*). La fucosamine et le fucose sont absents de *L. pneumophila* même si elle possède les autres sucres [Fox *et al.*, 1990].

1.1.3.7 Génome

L'analyse du génome permet également de caractériser *Legionella*, notamment par la taille du génome, par le contenu en guanine et cytosine (GC%) et par la présence d'un plasmide.
Le GC% des *Legionella* est très hétérogène puisque celui-ci peut être de 36,3% pour L. *cincinnatiensis* et s'élever jusqu'à 52% pour *L. rubrilucens* et *L. geestiana* [Hookey, 1996].
L'espèce *L. pneumophila* aurait un génome de $2{,}5.10^9$ daltons ce qui correspond à une taille de 4,1 Mb [Brenner, 1979].
Récemment, la souche Philadelphia [Chien *et al.*, 2004] et les deux souches de *L. pneumophila* (Lens et Paris) [Cazalet *et al.*, 2004] ont été séquencées ; les derniers mettant en évidence un plasmide et des tailles de génome de 3 Mb et 38% GC.

1.2 ECOLOGIE

1.2.1 Réservoirs de la bactérie *Legionella*

L'environnement hydrique constitue le réservoir majeur de *Legionella*. Cette bactérie n'a d'ailleurs jamais été retrouvée chez l'homme ou chez des animaux porteurs sains. Quant aux malades atteints de légionellose, ils excrètent la bactérie *Legionella* dans leur toux.

1.2.1.1 Habitat naturel

Legionella est une bactérie ubiquitaire de l'environnement hydrique mais elle colonise aussi, du fait de la présence d'eau, d'autres types d'habitats.

1.2.1.1.1 Milieu EAU

Le biotope aquatique (avec sa diversité) demeure le principal réservoir de *Legionella* [Fields *et al.*, 2002 ; Steinert *et al.*, 2002 ; Winn, 1988 ; Ciesielski *et al.*, 1984 ; Fliermans *et al.*, 1981]. En effet, la bactérie a pu être isolée aussi bien dans les lacs anciens [Fliermans *et al.*, 1981] et les lacs nouvellement formés (à la suite d'une éruption volcanique) [Tison *et al.*, 1983], qu'au niveau de rivières et de leurs rives [Fliermans *et al.*, 1981], dans les eaux de pluie [Albrechtsen, 2002] et même au niveau des eaux souterraines [Costa *et al.*, 2005 ; Brooks *et al.*, 2004 ; Riffard *et al.*, 2001 ; Bhopal, 1995].

Legionella a également été retrouvée dans l'eau de mer [Palmer *et al.*, 1993 ; Ortiz-Roque et Hazen, 1987]. Toutefois, *Legionella* est moins résistante dans l'eau de mer qu'en eau de lac ou rivière [Dutka, 1984] du fait de l'action combinée de la salinité et des rayonnements solaires, tous deux altérant sa survie [Dutka, 1984].

1.2.1.1.2 SOL et autres milieux

Le sol est impliquée comme source d'infection dans de rares cas de maladie du Légionnaire [Wallis et Robinson, 2005] mais dans aucun cas déclaré de fièvre de Pontiac. De ce fait, il n'y a que de rares travaux qui tentent d'isoler *Legionella* de sols humides [Morris *et al.*, 1979].

Certains auteurs soulignent aussi la présence de *Legionella* dans des composts [Koide *et al.*, 2001 ; CDC, 2000 ; Koide *et al.*, 1999 ; Hughes et Steele, 1994 ; Steele *et al.*, 1990a et b]. L'espèce *L. longbeachae* est fréquemment retrouvée dans le terreau de rempotage et a été associée à plusieurs cas d'infections lors de l'utilisation de ce compost [CDC, 2000 ; Koide *et al.*, 1999 ; Steele *et al.*, 1990a]. Alors que *Legionella* est en très faible quantité dans les mélanges de débris végétaux, leur concentration augmente lors du processus de fermentation grâce au dégagement de chaleur [Steele *et al.*, 1990].

1.2.1.2 Principaux réservoirs artificiels

A partir des divers types de milieux hydriques naturels, la bactérie colonise des environnements hydriques artificiels lorsque les conditions favorables sont réunies : une température d'eau comprise entre 35 et 45°C, une éventuelle stagnation d'eau, la présence de certains matériaux (fer, silicone), le dépôt de tartre, la présence d'autres microorganismes (bactéries, protozoaires, algues), ... [Steinert *et al.*, 2002].

Legionella est aussi ubiquitaire de ces systèmes hydriques artificiels [Koneman *et al.*, 1997] et comme il est souligné par le Centre National de Référence des légionelles (CNR), la présence des légionelles dans les milieux hydro-telluriques n'est pas extraordinaire : leur fréquence est estimée à 50% des prélèvements réalisés même si leur isolement dans un circuit d'eau est rarement associé à l'apparition d'une maladie [Door et Blandin, 2005].

1.2.1.2.1 Réseaux d'eau chaude sanitaire

De nombreuses études illustrent la colonisation des réseaux d'eau chaude par les légionelles. Elles sont retrouvées aussi bien dans les réseaux d'eau chaude sanitaire des hôpitaux [Leoni *et al.*, 2005 ; Perola *et al.*, 2005 ; Alary et Joly, 1992], des établissements communautaires (hôtel, immeuble) [Borella *et al.*, 2005 ; Leoni *et al.*, 2005], et des réseaux municipaux [States *et al.*, 1987].

Le rôle de la température aussi bien en production qu'en distribution d'eau chaude semble être un des facteurs déterminant sur la présence de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude sanitaire. Diverses études menées en milieu hospitalier ont montré que la colonisation du système était plus fréquente lorsque la température circulant dans les tuyaux était inférieure à 50°C ou 60°C [Plouffe *et al.*, 1983 ; Vickers *et al.*, 1987]. De même une étude réalisée sur 55 résidences aux Etats-Unis a montré que les réseaux d'eau contaminés en *Legionella* présentaient une température moyenne de 40,5°C [Lee *et al.*, 1988]. L'ancienneté des ballons de stockage d'eau chaude des installations a aussi été mis en relation avec la présence de *Legionella* [Alary et Joly, 1992 ; Vickers *et al.*, 1987] ; au delà de l'âge de l'installation, on peut suspecter l'influence d'une mauvaise maintenance conduisant à des phénomènes de corrosion ou d'entartrage des parois internes du ballon.

Certains métaux comme le fer ou le zinc favoriseraient le développement de la bactérie dans l'eau potable [States *et al.*, 1987] : en effet, à des concentrations, même faibles, de 0,05 $mg.L^{-1}$ de zinc ou de fer, une croissance de 1 à 2 log de *Legionella* cultivable est observée après cinq semaines de contact. Quant aux matériaux utilisés dans les réseaux de distribution, il semble que le cuivre limite plus ou moins durablement la colonisation comparativement aux matériaux plastique (PVC, PE, PEX) qui semblent la favoriser [Van der Kooij *et al.*, 2005 ; Rogers *et al.*, 1994 ; Bezanson *et al.*, 1992].

1.2.1.2.2 Tours aéroréfrigérantes

Les tours aéroréfrigérantes sont des systèmes de refroidissement d'eau pouvant fonctionner soit par voie humide soit par voie sèche. Mais, seuls, les systèmes par voie humide constituent un risque de dispersion de *Legionella* puisque les deux fluides, l'eau et l'air sont en contact direct [Guide des bonnes pratiques, 2001]. De nombreuses épidémies à *Legionella* sont associées à la contamination de ce type de tours aéroréfrigérantes [Nhu Nguyen *et al.*, 2006 ; Brown *et al.*, 1999 ; Addiss *et al.*, 1989 ; Friedman *et al.*, 1987 ; Cordes et Fraser, 1980].

Ces systèmes sont en effet des milieux favorables à *Legionella* compte tenu de la température de l'eau, comprise entre 20 et 40°C [Cordes et Fraser, 1980]. De plus, ces systèmes associés aux circuits de refroidissement des sites industriels ou dans les bâtiments climatisés ont pour fonction d'évacuer la chaleur vers l'extérieur en pulvérisant de l'eau en fines gouttelettes dans un flux d'air circulant à contre courant. Cette circulation de l'air naturelle ou forcée (présence d'un ventilateur), provoque l'entraînement d'un aérosol de gouttelettes et leur dispersion dans le panache [CSHPF, 2001]. *Legionella* peut coloniser l'eau des tours et ensuite être véhiculée dans l'air extérieur par le panache qui s'en dégage.

1.2.1.2.3 Autres installations

Il existe d'autres installations à réservoir d'eau artificiel qui sont susceptibles à la fois d'être colonisées par *Legionella* et d'être potentiellement génératrices d'aérosols. Les sources d'exposition les plus fréquemment mises en cause dans les cas de légionelloses sont les bassins d'eau utilisés pour la détente, la balnéothérapie ou le thermalisme comportant de l'eau chaude agitée (piscines, bains à remous, ...) [Benin *et al.*, 2002 ; Jernigan *et al.*, 1996], les eaux thermales [Martinelli *et al.*, 2001], les fontaines décoratives [Correia *et al.*, 2001 ; Hlady *et al.*, 1993] et plus récemment les machines à glace [Bangsborg *et al.*, 1995 ; Graman *et al.*, 1997].

D'autres sources d'aérosolisation ont été recensées comme les nébuliseurs, qu'ils soient destinés à un usage médical ou non [Blatt *et al.*, 1993 ; Mahoney *et al.*, 1992 ; Woo *et al.*, 1986] ou les humidificateurs [Zuravleff *et al.*, 1983 ; Mahoney *et al.*, 1992]. Les bassins d'aération de boues activées des stations d'épuration [Gregersen *et al.*, 1999] ont été aussi mis en cause lors de cas de légionelloses. De plus en plus recherchée, *Legionella* est aussi retrouvée dans les eaux des unités dentaires [Singh et Coogan, 2005 ; Atlas *et al.*, 1995].

1.2.2 Devenir de *Legionella* dans l'environnement

1.2.2.1 Survie dans l'EAU

Quelques études se sont attachées à identifier les paramètres jouant un rôle dans l'occurrence de légionelles dans le milieu naturel et dans les réseaux de distribution d'eau potable. Elles ont tenté, à partir de mesures sur des réseaux de distribution d'eau potable de prédire l'apparition de *Legionella* [Borella *et al.*, 2005 ; Alary et Joly, 1992]. Les principaux facteurs d'influence dans l'environnement naturel sont la température, le pH, les rayonnements, ... Ainsi, les paragraphes suivants décrivent de manière non exhaustive quelques uns de ces facteurs.

1.2.2.1.1 Température

Les relations entre la température de l'eau et la présence de *Legionella* sont très largement documentées et décrites dans des travaux déjà anciens. La température de l'eau est sans doute un des paramètres les

plus importants gouvernant la présence de *Legionella* puisqu'elle influence à la fois sa multiplication et sa survie.

En effet, il est admis que *Legionella* se multiplie dans le milieu hydrique à des températures comprises entre 20 et 45°C et qu'elle a la capacité d'y survivre entre 6 et 66°C [Habicht et Muller, 1988 ; Wadowsky *et al.*, 1985 ; Fliermans *et al.*, 1981 ; Tison *et al.*, 1980]. En effet, la cultivabilité de *Legionella* diminue après plus de 20 jours à partir d'une température de 42°C et seulement après 25 min. à 60°C (Figure 1.1). Ces résultats confortent ceux de Dennis *et al.* où *Legionella* perdait sa capacité à cultiver à partir de 50°C [Dennis *et al.*, 1984].

Legionella a été aussi isolée dans des eaux douces naturelles dont la température était comprise entre 0°C (rivière gelée) et 63°C [Bornstein et Fleurette, 1992 ; Fliermans *et al.*, 1981], dans des sols de la toundra sibérienne atteignant au maximum en plein été une température de 10°C [Zhou *et al.*, 1997] et dans des eaux potables de 3-4°C à la sortie de station de potabilisation [Wullings et Van der Kooij, 2006].

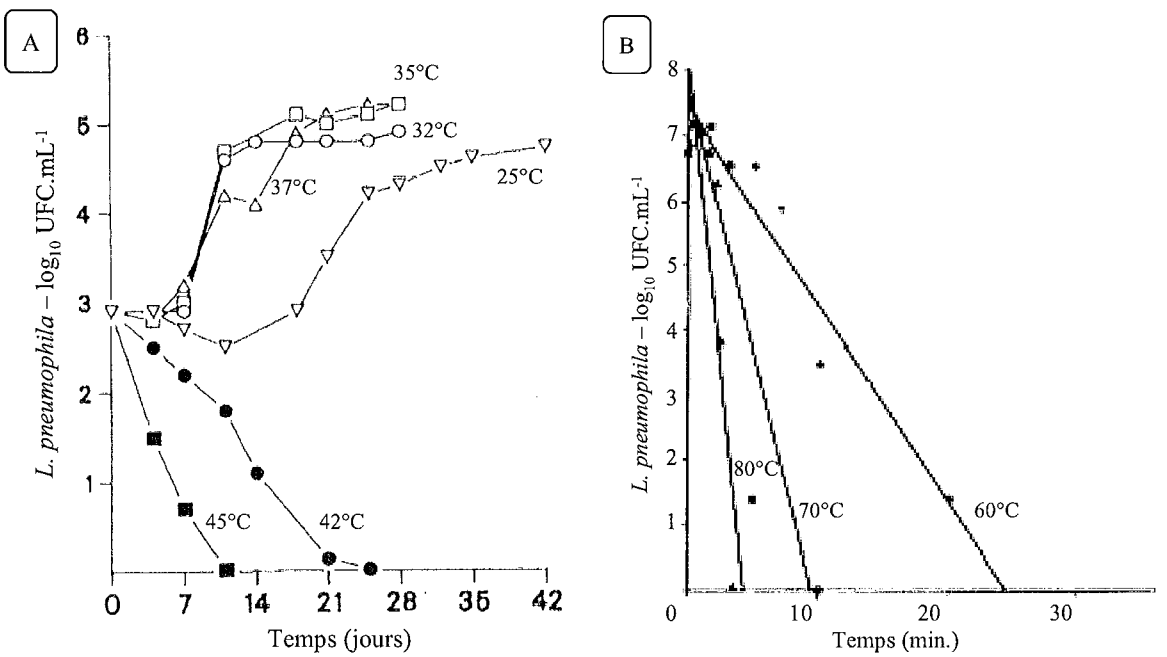


Figure 1. 1 : Effet de la température de l'eau potable sur la survie de L. pneumophila cultivable - A : de 25 à 45°C [Wadowsky *et al.*, 1985] ***; B : de 60 à 80°C*** [Stout *et al.*, 1986].

1.2.2.1.2 Le pH

La croissance de *Legionella*, dans l'eau potable, a été observée à des pH variant de 5,5 à 8,5 mais le pH optimal est de 6,9 [Wadowsky *et al.*, 1985]. D'ailleurs, plusieurs études corroborent le fait que *Legionella* puisse survivre dans une large gamme de pH dans l'eau, puisque dans des échantillons d'eau environnementale, *Legionella* a été détectée à des valeurs de pH s'étendant de 6,4 à 8,5 [Leoni *et al.*, 2005 ; States *et al.*, 1987].

Toutefois, une étude récente réalisée avec des microcosmes met en évidence que *Legionella* peut résister à des pHs extrêmes, pH=2, durant cinq jours dans l'eau [Ohno *et al.*, 2003].

1.2.2.1.3 Rayonnement solaire et ultraviolet

Le rayonnement solaire affecterait la croissance de *Legionella* en eau peu profonde, aussi bien en eau de mer qu'en eau douce. En effet, un abattement de *Legionella* cultivables de 5 log est constaté après 6 heures d'exposition solaire naturelle [Dutka, 1984]. Toutefois les légionelles seraient plus résistantes dans l'eau que des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *E. coli* pour lesquelles l'inactivation, mesurée par la perte de cultivabilité est totale après respectivement 4 et 3 heures d'exposition solaire naturelle [Dutka, 1984].

Cette moindre sensibilité des légionelles aux rayonnements U.V. par rapport à celle d'*E. coli* a été corroborée par une étude récente [Oguma *et al.*, 2004] où des cultures pures de *L. pneumophila* et *E. coli* ont été exposées à deux types de lampes U.V. (monochromatique à 254 nm et non-monochromatique [240-580 nm]).

Deux hypothèses sont avancées pour expliquer la relative résistance de *Legionella* aux rayonnements U.V.. D'une part, Oguma *et al.* [2004] ont montré que *Legionella*, comparée à *E. coli*, avait une activité photolyase plus importante et était capable de réparer son contenu pyrimidique plus rapidement. Ainsi, quand *Legionella* est soumise aux rayonnements U.V., elle est capable, contrairement aux autres bactéries de mettre en place rapidement ce processus de réparation cellulaire.

D'autre part, Tully [1991] a mis en évidence un plasmide conjugatif de 36 MDa permettant aux souches de *L. pneumophila* de résister aux rayonnements U.V..

1.2.2.1.4 Salinité

Legionella est retrouvée dans plusieurs types d'environnements marins : océans et mers [Palmer *et al.*, 1993 ; Ortiz-Roque et Hazen, 1987]. Même si la salinité (chlorure de sodium) est encore considérée comme inhibiteur de la croissance des légionelles, l'étude de Heller *et al.* [1998] montre une perte de la cultivabilité de *L. pneumophila* SG. 3 après deux jours à 30 $g.L^{-1}$ NaCl, alors que pour d'autres salinités (5 à 20 $g.L^{-1}$ NaCl) *L. pneumophila* SG. 3 a conservé sa capacité à cultiver. De même, une concentration de 10^3 cellules de *L. pneumophila* mise dans une suspension d'eau de mer (salinité en moyenne de 36 $g.L^{-1}$) peut survivre plus de six semaines [Palmer *et al.*, 1993].

1.2.2.1.5 Oxygène dissous

Legionella est une bactérie aérobie stricte. Aucune croissance de *Legionella* au sein du milieu eau n'est observée lorsque la teneur en oxygène dissous est inférieure à 2,2 $mg.L^{-1}$ mais elle reste cultivable [Wadowsky *et al.*, 1985]. C'est pourquoi, *Legionella* a pu être isolée par immunofluorescence dans les lacs dont la teneur en oxygène dissous était de 0,3 $mg.L^{-1}$ [Fliermans *et al.*, 1981].

D'autres études avancent l'hypothèse que *Legionella* pourrait être en fait microaérophile [Mauchline et Keevil, 1991 ; Rogers et Keevil, 1992].

Certains travaux ont tenté de mettre en relation la teneur en oxygène dissous dans l'eau et la présence de *Legionella* [Borella *et al.*, 2005 ; Fliermans *et al.*, 1981] ; les résultats tendent à conclure à une action protectrice de l'augmentation des teneurs en oxygène dissous contre la présence de *Legionella*. En effet, une étude réalisée sur plusieurs centaines d'échantillons d'eau de lacs et de rivières, dont les teneurs en oxygène dissous variaient de 0,5 $mg.L^{-1}$ à 9,6 $mg.L^{-1}$, conclut qu'une teneur supérieure à 5 $mg.L^{-1}$ d'oxygène dissous dans l'eau est protecteur contre la contamination en *Legionella*, mesurée par immunofluorescence [Fliermans *et al.*, 1981] ; mais aucune relation statistique significative n'a été démontrée. Toutefois, plus récemment, une relation statistique significative a été obtenue à partir de plus d'une centaine d'échantillons d'eau potable, où il a été démontré qu'une teneur en oxygène dissous supérieure à 3 $mg.L^{-1}$ était bien protecteur face à la présence de *Legionella* cultivable dans les réseaux d'eau [Borella *et al.*, 2005].

1.2.2.2 Survie et biofilm

Le biofilm est défini comme un ensemble d'organismes attaché à une surface solide et enchâssé dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (E.P.S.) [Donlan, 2001 ; Costerton *et al.*, 1995]. Ces E.P.S. sont constitués de protéines, sucres, lipides et acides nucléiques. On retrouve, dans un biofilm, à la fois des débris organiques et inorganiques (de corrosion par exemple), des algues, des protozoaires et des bactéries comme *Legionella*, qui colonisent les surfaces en contact avec l'eau, comme les réseaux d'eau potable [Batté *et al.*, 2003]. Le biofilm ne se présente pas sous la forme d'un dépôt homogène sur une surface ; des canaux et pores au niveau de sa structure permettent ainsi aux flux de liquide de circuler afin de permettre la diffusion et l'apport de nutriments et d'oxygène [Costerton *et al*, 1995] ; il joue donc le rôle de réservoir nutritif. Par ailleurs, le biofilm fournit un habitat pour la survie et la croissance de *Legionella* [Murga *et al.*, 2001 ; Rogers *et al.*, 1994].

L'interface eau-matériaux est le lieu privilégié pour l'accumulation de la matière organique, des bactéries ainsi que de leur multiplication [Martiny *et al.*, 2003]. Certains matériaux favoriseraient même la colonisation de *Legionella*, puisque les matériaux plastiques (PVC, PE, PEX) sembleraient favoriser sa colonisation et sa prolifération au contraire du cuivre [Van der Kooij *et al.*, 2005 ; Rogers *et al.*, 1994 ; Bezanson *et al.*, 1992].

Le biofilm assure aussi le rôle de niche protectrice vis-à-vis des désinfectants [Hall-Stoodley et Stoodley, 2005 ; Lejeune, 2003 ; Cargill *et al.*, 1992]. L'activité bactéricide des désinfectants comme le chlore est en effet moins efficace contre les bactéries du biofilm que les bactéries en suspension [Green et Pirrie, 1993 ; Green, 1993].

Williams et Braun-Howland [2003] ont même mis en évidence la persistance de l'activité physiologique par hybridation *in situ* de *Legionella* au niveau d'un biofilm, aussi bien avant et après un traitement à la monochloramine (4 $mg.L^{-1}$ pendant 155 minutes).

1.2.2.3 Survie dans l'AIR

La survie du bioaérosol dépend de sa capacité à résister aux stress de l'environnement. Pour la plupart des bactéries, l'air est un milieu extrême et la létalité occasionnée par l'aérosolisation est importante. Elle dépend essentiellement de la résistance intrinsèque des espèces au stress induit par l'aérosolisation et par l'exposition aux facteurs environnementaux (Tableau 1.2). Ainsi, les paragraphes suivants décrivent de manière non exhaustive les actions et phénomènes impliqués, lorsqu'ils sont connus, lors des stress bactériens liés à l'aérosolisation. Il est important de noter que très peu de travaux font état des dommages subis par l'aérosol de *Legionella* face aux conditions environnementales ; dans la mesure du possible, des parallèles sont faites avec les connaissances acquises dans ce domaine pour les autres bactéries aéroportées.

Tableau 1. 2 : Cibles moléculaires d'une bactérie aéroportée soumise aux stress du milieu aérien [Cox, 1989].

Stress de l'environnement AIR	**Cible moléculaire**
Humidité relative et la température	Protéine dite majeure (OMP), protéines
Oxygène	Phospholipides, membranes
Ozone	Phospholipides, membranes
Open air factor (ozone-oléfines)	Phospholipides, membranes, acides nucléiques
Rayonnements UV, rayons-γ et rayons X	Phospholipides, membranes, acides nucléiques

Les récents travaux de Ha [2005] ont mis en évidence des réponses différentes aux stress environnementaux suivant les espèces et sérogroupes de *L. pneumophila*. Ils indiquent notamment que la survie mesurée par l'intégrité membranaire des légionelles est accrue pour la souche épidémique de Lens par rapport à l'espèce *L. pneumophila* SG. 6. En effet, il s'est avéré que pour *L. pneumophila* SG. 1 (souche Lens) et *L. pneumophila* SG. 6 (souche environnementale) aérosolisées dans les mêmes conditions, aucune différence sur la survie en terme de capacité à cultiver n'a pu être démontrée. Par contre, une résistance accrue de la souche Lens a été mise en lumière, au regard de son intégrité membranaire : après 70 heures d'étude de survie, 80% de l'aérosol de la souche Lens a une intégrité membranaire intacte contre seulement 10% pour la *L. pneumophila* SG.6.

1.2.2.3.1 Phase de croissance

L'état physiologique des bactéries aérosolisées influe sur leur survie dans le milieu aérien. En effet, Hambleton *et al.* [1983] ont étudié l'effet de l'activité métabolique des bactéries aéroportées sur leur

survie en terme de cultivabilité. Pour se faire, ils ont travaillé à la fois à partir de bactéries en phase exponentielle et stationnaire de croissance, cultivées en milieu liquide (Figure 1.2). Il s'est avéré que *Legionella* en phase stationnaire de croissance était plus stable dans les aérosols.

Ces travaux suggèrent que des bactéries environnementales, ayant donc *à priori* une physiologie [Hambleton *et al.*, 1983] plus faible et plus ralentie survivent mieux à l'aérosolisation.

1.2.2.3.2 Humidité et température

Suivant le taux d'humidité et la température environnants, la dessiccation des bactéries s'opérant lors de l'aérosolisation sera plus ou moins importante. Cette perte en eau a un effet à la fois sur la structure et sur les fonctions de la cellule bactérienne [Webb, 1959].

Ainsi, au travers de quelques études n'utilisant que la cultivabilité pour mesurer les légionelles, l'humidité relative de l'air et la souche aérosolisée ont été identifiées comme des paramètres influençant la réponse des bactéries au stress de la dessiccation lors de l'aérosolisation :

- Les premiers travaux consacrés à l'étude de la survie de la bactérie ont montré que les aérosols de légionelles présentaient une persistance accrue à 60% d'H.R., allant de 1 à 30 min [Dennis et Lee, 1988 ; Hambleton *et al.*, 1983 ; Berendt, 1980]. De même, les expériences de Hambleton *et al.* [1983] révèlent aussi qu'environ un tiers de la population de légionelles reste cultivable à 20°C et 65% d'H.R. et ce 30 minutes après aérosolisation (Figure 1.2)

De plus récents travaux [Ha, 2005] ont démontré que l'effet de l'humidité relative à 20°C se montrait variable avec l'âge de l'aérosol, traduisant l'implication de divers mécanismes dans la réponse biologique des microorganismes aérosolisés. Lors de la dispersion, un milieu sec, déterminant d'une cinétique d'évaporation rapide, favorise la conservation des caractéristiques culturales de légionelles [Ha, 2005]. A court terme (de 30 min à 1 h), ce même milieu sec s'avère plus létal qu'un environnement humide, du fait de l'action combinée de l'O_2 présent dans l'air. A plus long terme, la mesure de la survie de l'aérosol de légionelles converge une nouvelle fois vers un effet létal de l'humidité après 24h [Ha, 2005].

- une ancienne étude réalisée en laboratoire sur des légionelles en suspension dans un aérosol à 65% d'humidité relative a montré qu'elles peuvent survivre au moins 2 heures [Hambleton *et al.*, 1983].
- *L. pneumophila* sérogroupe 1 -sous-type Pontiac- survit mieux que les autres sous-types de *L. pneumophila* [Dennis et Lee, 1988].

1.2.2.3.3 Oxydants de l'air

Un aérosol de *Legionella* est soumis aux mêmes stress environnementaux que d'autres bactéries aérosolisées. Par manque de données sur *Legionella*, les données qui suivent concernent d'autres espèces de bactéries aéroportées.

Selon Israeli *et al.* [1994], la plupart des microorganismes aérosolisés sont sensibles à l'oxygène (O_2). La toxicité de l'O_2 est accrue avec le temps d'exposition, le degré d'humidité relative et la concentration en oxygène [Israeli *et al.*, 1994]. L'effet létal de l'O_2 [Hess, 1965] est démontré pour un taux d'humidité relative inférieur à 70% [Cox, 1989]. En dessous de ce taux, la toxicité s'accentue avec la concentration en O_2 jusqu'à un seuil maximum de toxicité de l'O_2 à une concentration de 30% [Cox, 1989].

L'ozone exerce une activité létale sur les microorganismes aérosolisés en fonction du taux d'oléfines dans l'atmosphère. L' « Open Air Factor » ou O.A.F. désigne l'ensemble des produits de réaction toxiques de l'ozone-oléfines. Cette toxicité est liée aux propriétés de surface des microorganismes, puisque l'O.A.F. réagit avec les acides gras formant des substances toxiques comme les hydroperoxydes. Les bactéries Gram négatif seraient plus sensibles aux O.A.F. par leur riche composition en lipides de la paroi [Cox, 1989].

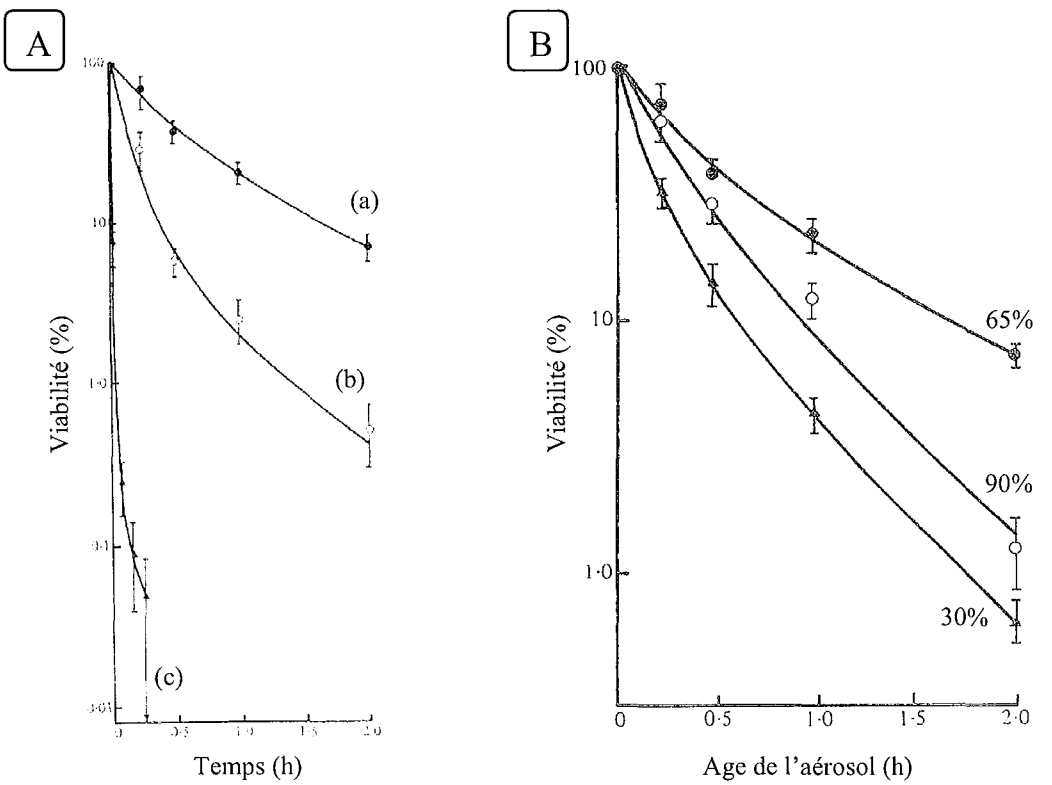


Figure 1. 2 : Survie d'un aérosol de <u>L. pneumophila</u> - A : à 65% d'humidité relative en fonction de l'âge du bioaérosol – a) croissance sur milieu solide pendant 4 jours ; b) croissance en milieu liquide en phase stationnaire ; c) en phase exponentielle ; B : en fonction du taux d'humidité relative et en fonction de son âge [Hambleton *et al.*, 1983].

1.2.2.3.4 Rayonnements solaires

Les radiations énergétiques (rayons X, γ et U.V.) agissent à plusieurs niveaux au sein des cellules bactériennes (acides nucléiques, protéines, membranes) provoquant des réactions radicalaires qui

altèrent les acides nucléiques [Cox, 1989]. En effet, plusieurs études ont montré que les bactéries aéroportées, en l'absence de rayonnement solaire, ont un taux de survie supérieur [Goff *et al.*, 1973 ; Fedorak et Westlake, 1978]. Les bioaérosols collectés, sans protection vis-à-vis de la lumière présente une sous cultivabilité d'un facteur 2,6 à 8,3 par rapport à ceux collectés à l'abri de la lumière [Fedorak et Westlake, 1978].

Les récents travaux de Ha [2005] corroborent cette hypothèse, puisqu'ils montrent que l'exposition solaire d'une journée horaire hivernale (reproduite par l'exposition à une dose d'U.V.-A estimée à 30 $W.m^{-2}$) provoque une perte de cultivabilité de 83% de l'aérosol de *Legionella*, comparé à un aérosol soumis à l'obscurité, tandis qu'aucune altération de la membrane des bactéries aéroportées n'a pu être observée.

1.2.3 Relations de *Legionella* avec les protozoaires et procaryotes

Afin de se prémunir des facteurs environnementaux influençant sa survie, *Legionella* a adopté des stratégies de protection, notamment par l'établissement de relations avec les protozoaires et les procaryotes de l'environnement.

1.2.3.1 Relations *Legionella*-protozoaires

Les protozoaires sont des hôtes naturels de *Legionella* et en constituent un des principaux réservoirs [Rowbotham, 1984]. *Legionella* est donc une bactérie protozoonotique, c'est à dire capable d'infecter des protozoaires et des êtres humains [Rowbotham, 1983]. En effet, 14 espèces d'amibes libres et 2 espèces de protozoaires ciliés ont été identifiées comme support potentiel de multiplication intracellulaire de *Legionella* dans l'environnement [Fields *et al.*, 2002].

Le rôle central des protozoaires, organismes phagotrophiques par excellence [Finlay *et al.*, 1993], dans les écosystèmes aqueux est aujourd'hui bien connu. En tant que prédateurs majeurs de phytoplanctons et de bactéries, ils contribuent aux flux nutritifs dans l'environnement. De plus, la présence simultanée des deux types de microorganismes - *Legionella* et protozoaires - n'est pas rare. Ils sont fréquemment retrouvés ensemble notamment dans les eaux [Fields *et al.*, 2002 ; Barbaree *et al.*, 1986] ou les sols contaminés [Newsome *et al.*, 1998 ; Rowbotham, 1980].

L'analyse faite par les microbiologistes de ces relations entre bactéries et protozoaires a été longtemps exclusivement axée sur une vision de la dynamique proie-prédateur. Depuis ces dernières années, tout l'intérêt se porte sur le fait que de nombreuses bactéries survivent voire se multiplient dans certains protozoaires. Notamment, le rôle de « cheval de Troie » attribué à certaines amibes hébergeant des légionelles [Molofski et Swanson, 2004] ou d'autres pathogènes [Snelling *et al.*, 2006 ; Molmeret *et al.*, 2005] est maintenant bien établi et un nombre croissant d'interactions microorganismes-protozoaires est décrit actuellement [Greub et Raoult, 2004].

Le cycle de vie des amibes libres se caractérise par deux formes, une forme végétative métaboliquement active et mobile : le trophozoïte et une forme immobile de résistance à des conditions environnementales hostiles : le kyste [Philippe *et al.*, 2006].
La capacité des protozoaires à former des kystes (dans des conditions écologiques défavorables) peut être exploitée par *Legionella* puisqu'elle a été retrouvée dans des kystes amibiens [Kilvington et Price, 1990]. Ceci permet de protéger *Legionella* et de la maintenir jusqu'à ce que les conditions lui deviennent plus favorables [Barbaree *et al.*, 1986]. Certaines amibes sont capables de sécréter des vésicules de 2 à 6 µm de diamètre renfermant *Legionella* [Berk *et al.*, 1998]. Ces vésicules pourraient peut être servir de particules infectieuses ou de protection face aux conditions défavorables.

La co-culture avec des amibes permet de rendre cultivables des bactéries devenues non-cultivables (tout en restant viables). Parmi ces bactéries, pour lesquelles la co-culture sert de réactivateur, se trouvent *Legionella* [Snelling *et al.*, 2006 ; Steinert *et al.*, 1997] mais aussi *Campylobacter* [Axelsson-Olsson *et al.*, 2005], *Vibrio cholerae* [Barker et Brown, 1994] et encore bien d'autres comme décrit dans la revue de Snelling *et al.* [2006].

La capacité de *Legionella* à survivre dans des environnements défavorables peut être en partie expliquée par les différences de protection offertes selon les espèces de protozoaires infectées. Ainsi le protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis* permet à *Legionella* de survivre dans des eaux chaudes [Nahapetian *et al.*, 1991], alors que l'espèce *Tetrahymena vorax*, qui elle, vit surtout dans des eaux froides, peut elle aussi permettre la survie de *Legionella* dans ces mêmes eaux froides [Smith-Somerville *et al.*, 1991].

Par ailleurs, l'hébergement de *Legionella* dans des protozoaires considérés comme amplificateurs de la bactérie [Kramer et Ford, 1994], pourrait aussi conduire à une expression de la virulence. En effet, les légionelles ayant fait un séjour intra-amibien ont une capacité d'infection accrue des cellules épithéliales [Cirillo *et al.*, 1994] puisqu'il existerait des similitudes entre les mécanismes d'infection de *Legionella* pour les amibes et pour les cellules eucaryotes [Brieland *et al.*, 1997a et b].

1.2.3.2 Relations avec les procaryotes

Legionella entretient deux types de relation avec les procaryotes (bactéries et cyanobactéries), certains lui sont favorables (mutualisme) et d'autres inhibent sa croissance (par des relations de type amensalisme, compétition ou de type parasitisme).

1.2.3.2.1 Procaryotes favorables

La croissance de *Legionella* est favorisée par d'autres bactéries telles que *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.* et *Flavobacterium sp.* [Kramer et Ford, 1994].

Une étude a même mis en évidence que la croissance de *Legionella*, sur milieu de culture en présence de *Flavobacterium sp.,* s'effectue alors comme une croissance satellitaire où des petites colonies de *Legionella* croient autour de l'espèce synergiste [Wadowsky et Yee, 1983]. Une hypothèse a été avancée par plusieurs auteurs : ces bactéries accompagnatrices fourniraient des éléments nutritifs nécessaires à la croissance de *Legionella* [Kramer et Ford, 1994, Stout *et al.*, 1985 ; Wadowsky et Yee, 1985 ; Wadowsky et Yee, 1983].

La croissance de *Legionella* est améliorée en association (mutualisme) avec les cyanobactéries du genre *Fischerella sp.*, *Oscillatoria sp.* et *Phormidium sp.* : le CO_2 produit par *Legionella* serait utilisé par ces microorganismes photosynthétiques [Tison *et al.*, 1980 ; Bohach et Snyder 1983]. Ceux-ci permettraient la survie de *Legionella* en lui fournissant les nutriments nécessaires à sa croissance extracellulaire dans l'environnement.
En plus de son association nutritive, *Fischerella sp.* permettrait d'augmenter la stabilité de la concentration de *Legionella* dans les aérosols [Berendt, 1981]. Toutefois, cette hypothèse peut être remise en cause car aucune étude ne vient la corroborer et les mécanismes associés à cette stabilité restent encore inconnus.

Le mutualisme de *Legionella* a été aussi démontré avec les algues vertes (*Chlorella* et *Gloeocystis*) au niveau desquelles, la bactérie est capable d'adhérer à la surface : une seule algue verte peut transporter plusieurs dizaines de *Legionella* [Hume et Hann, 1984]. Les auteurs avancent l'hypothèse que ce mutualisme pourrait être comparé à celui existant entre *Legionella* et les cyanobactéries où les algues vertes et *Legionella* échangeraient des éléments nutritifs [Hume et Hann, 1984].

1.2.3.2.2 Espèces néfastes pour Legionella

Toutes les bactéries présentes dans l'environnement ne sont pas favorables à *Legionella.* Certaines d'entre elles peuvent même inhiber sa croissance soit par la synthèse d'un métabolite bactéricide et/ou bactériostatique (amensalisme), soit par la consommation d'un nutriment nécessaire à *Legionella* (compétition), ou soit par une activité prédatrice vis-à-vis de *Legionella* (parasitisme).
Ainsi, pour une des espèces bactériennes communes des réseaux d'eau : *Staphylococcus* [Toze *et al.*, 1990], une étude a corroboré l'hypothèse de sécrétion de substances bactéricides en prouvant que *Staphylococcus warneri* sécrétait un peptide inhibiteur de *Legionella* [Héchard *et al.*, 2005].
Le seul parasite bactérien connu à l'heure actuelle de *Legionella* est l'espèce *Bdellovibrio bacteriovorus* [Tomov *et al.*, 1982 ; Richardson, 1990] présente dans les sols et eaux contaminés. Après attachement et pénétration dans la cellule bactérienne, le parasite se multiplie entre la paroi et la membrane cytoplamsique (bdellokyste) puis est libéré dans l'environnement par lyse de la bactérie.

1.3 MODES DE CONTAMINATION ET DE TRANSMISSION

La contamination des personnes exposées à *Legionella* se fait essentiellement par inhalation d'un aérosol d'eau contaminée par la bactérie [Fields *et al.*, 2002]. Les légionelles aérosolisées atteignent les alvéoles pulmonaires, infestent les macrophages pulmonaires et provoquent leur destruction (Figure 1.3 et § 1.4 de ce chapitre).

Quelques contaminations par « fausses routes alimentaires » (aspiration lors d'ingestion d'eau) ont été rapportées chez des patients après chirurgie oncologique réalisée au niveau de la tête et du cou. Il pourrait se former un aérosol lors de ces « micro-aspirations » [Graman *et al.*, 1997]. La manipulation de terreau a été à l'origine de cas de maladie du Légionnaire en Australie et aux Etats-Unis [Montanaro-Punzengruber *et al.*, 1999 ; CDC, 2000]. L'hypothèse d'inhalation d'aérosols de *Legionella* avec ce terreau humide contaminé est émise puisque ces personnes l'avaient manipulé pendant plusieurs jours avant l'apparition de la maladie. A l'heure actuelle, aucune contamination ni transmission interhumaine n'a été démontrée [Benhamou *et al.*, 2005].

L'infectiosité d'un aérosol est étroitement liée à différents paramètres : les caractéristiques physiques de cet aérosol humide et sa concentration en *Legionella* avec leur capacité à survivre dans l'aérosol. Pour l'heure, seul le premier critère est décrit dans la littérature de manière empirique. Ainsi, un aérosol ne peut être infectieux que si les particules qui le composent sont assez petites pour atteindre les alvéoles pulmonaires (diamètre inférieur ou égal à 5 µm) [Bollin *et al.*, 1985 ; Girod *et al.*, 1982] et assez grandes pour contenir une ou plusieurs bactéries (diamètre supérieur à 2 µm) [Baron et Willeke, 1986].

A l'heure actuelle, aucune relation fiable n'a pu être mise en évidence entre la concentration en *Legionella* dans l'eau ou dans l'air et le développement de la maladie chez l'homme.

1.4 PATHOGENICITE

La pathogénicité est la capacité de *Legionella* à provoquer une maladie (légionellose) sous une des deux expressions cliniques : la maladie du Légionnaire (maligne) et la fièvre de Pontiac (bénigne). La virulence est un paramètre de pathogénicité qui peut varier au sein même d'une espèce ou d'un groupe d'espèces. Cette virulence s'exprime au travers de facteurs phénotypiques ou génomiques, de l'espèce pathogène, mais elle peut aussi être influencée par l'environnement.

1.4.1 Cellules hôtes

Legionella est un pathogène intracellulaire facultatif [Winn, 1988]. Elle peut donc se multiplier extracellulairement (en laboratoire : sur des milieux de culture ; dans l'environnement : au sein des

matrices eau et biofilm), et intracellulairement (au sein de des cellules de mammifères : monocytes, macrophages) (Figure 1.3).

Chez l'homme, *Legionella* établit un foyer infectieux au sein de l'alvéole pulmonaire où la bactérie interagit avec les macrophages et les cellules épithéliales pour lesquelles elle possède un tropisme particulier. Ces deux entités cellulaires constituent la «porte d'entrée» de l'infection et de la dissémination de la maladie chez l'homme.

Dans cette étape d'infectiosité, l'action du macrophage alvéolaire est non seulement significativement neutralisée mais elle constitue aussi une niche réplicative potentielle, avec une augmentation de l'inoculum bactérien jusqu'à la 72ème heure dans le cul-de-sac alvéolaire [Brieland *et al.*, 1997b].
Une deuxième entité cellulaire importante s'est révélée permissive à *L. pneumophila* : la cellule épithéliale alvéolaire, qui constitue aussi une autre niche de multiplication pour la bactérie [Mody *et al.*, 1993].

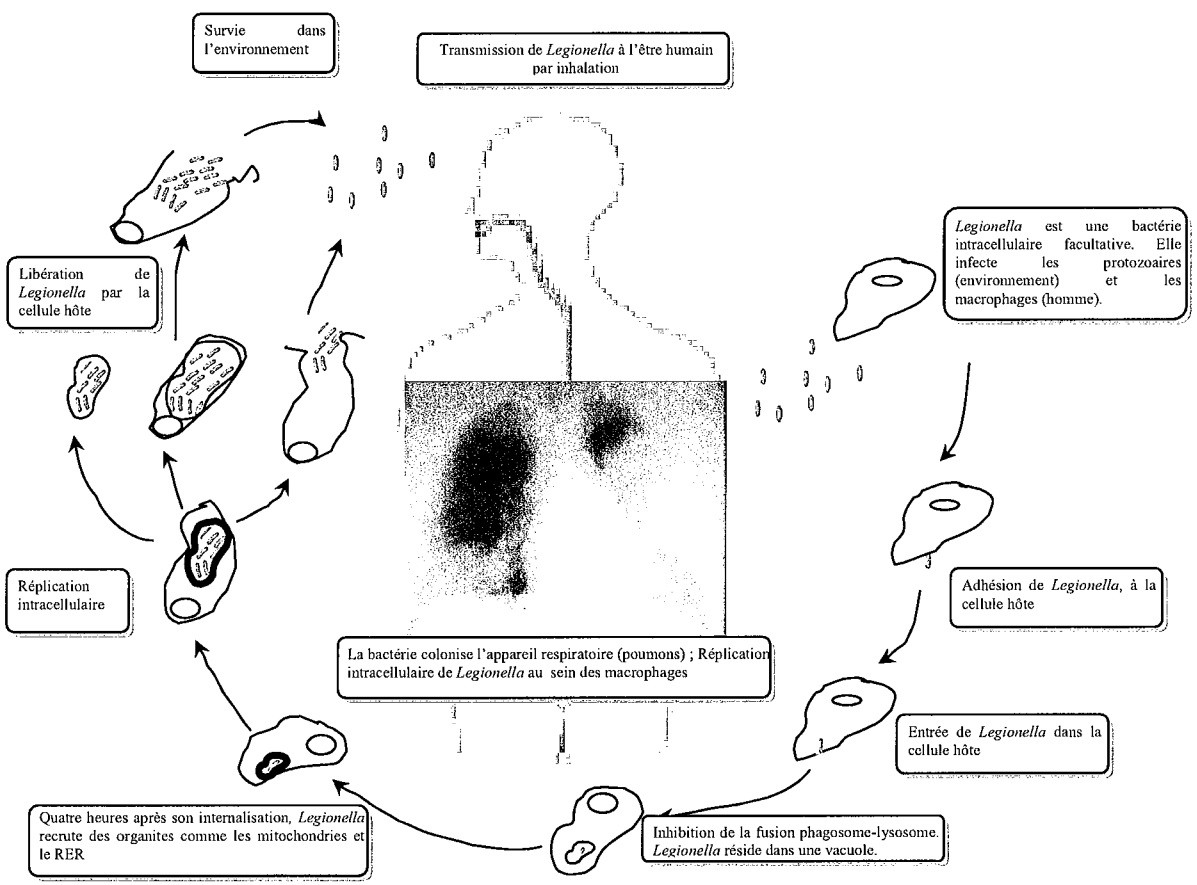


Figure 1. 3 : Cycle de vie de <u>Legionella</u>.

La capacité de *Legionella* à se reproduire au sein des cellules de mammifères est dépendante de l'espèce et même du sérogroupe de la bactérie [Neumeister *et al.*, 1997]. En effet, une étude été menée sur des cellules humaines de monocytes (Mono Mac 6 Cells) infectées par différentes espèces de *Legionella* afin d'évaluer, par culture, la capacité de multiplication des bactéries. Il s'est avéré, par exemple, que *L. dumoffii*, *L. jordanis* et *L. longbeachae* n'étaient pas capables de se multiplier intracellulairement alors que le taux de croissance de *L. bozemanii* et *L. micdadei* était de 10% par heure. De manière concomitante, l'étude a été réalisée sur neuf sérogroupes de *L. pneumophila* (SGs 1 à 9), et il s'est avéré que le taux de croissance variait d'un SG. à l'autre, de 2% (SG.9) à 8% (SG.6) par heure et que *L. pneumophila* SG.8 était incapable de se multiplier.

1.4.2 Facteurs de virulence et mécanisme de pathogénicité

Lors de l'infection d'une cellule hôte, *Legionella* suit le même processus ou cycle de pathogénicité : elle adhère, pénètre dans la cellule, résiste aux mécanismes de défenses au sein de la cellule hôte, se multiplie et quitte la cellule hôte pour infecter d'autres cellules.

Au cours de ce cycle infectieux, deux états bactériens pour *L. pneumophila* sont distincts, symbole d'une remarquable plasticité phénotypique [Steinert *et al.*, 2002] :

- un état intracellulaire au cours duquel une réplication se déroule au sein d'une vacuole cloisonnée (phagolysosomiale) qui permet à la bactérie d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et d'utiliser le métabolisme cellulaire à son profit. Au cours de cette phase réplicative, les bactéries sont majoritairement en phase exponentielle de croissance, de forme longue, sans flagelle, osmo-résistante (Na+) et présentent une faible activité cytotoxique et une faible résistance aux stress.
- un état extracellulaire infectant qui correspond à un état stationnaire de croissance de *Legionella*, qui possède une forme en bâtonnet épais et court pourvu de flagelles donc mobile, est osmo-sensible (Na+) avec une forte activité cytotoxique et une meilleure résistance aux stress.

De récents travaux *in vitro* ont permis de démontrer la réversibilité d'un état à l'autre appelée « variation de phase » [Molofsky et Swanson, 2004, Cazalet *et al.*, 2004]. Cette notion est cependant encore théorique aujourd'hui mais permettrait en partie d'expliquer que *Legionella* soit capable d'alterner un état phénotypique adapté aux conditions de stress environnemental avec un état intracellulaire pathogène.

1.4.2.1 Adhésion et entrée de *Legionella* dans la cellule

La première étape de la pathogenèse de *Legionella* est la colonisation de la cellule hôte. Chez l'homme, elle se traduit par une adhésion aux cellules épithéliales des muqueuses respiratoires qui vont interagir avec les récepteurs spécifiques du macrophage.

- Les facteurs de virulence intervenant dans cette étape de la pathogénicité de *Legionella* sont essentiellement des structures de surface.

Le LPS, couche lipopolysaccharidique, intervient dans l'adhésion de *Legionella* à la muqueuse respiratoire [Bornstein et Fleurette, 1992 ; Rodgers et Oldham, 1984].

La protéine MOMP encodée par *ompS* permet l'attachement aux macrophages *via* les récepteurs CR1 et CR3 [Steinert *et al.*, 2002 ; Krinos *et al.*, 1999]. De plus, son activité similaire à celle d'une porine [Gabay *et al.*, 1985] lui permet d'adhérer aux membranes des cellules hôtes et d'ouvrir des canaux permettant le passage d'ions, facilitant ainsi l'entrée dans des cellules hôtes [Dowling *et al.*, 1992].

Les pilis de type IV, désignés par CAP (Competence and Adherence-associated Pilus), sont caractérisés par une extrêmité adhésive et sont situés à la surface de *Legionella*. Ils interviennent dans le mécanisme d'attachement aux cellules hôtes [Leclerc, 2006]. La prépiline peptidase (PilD) encodée par les gènes $pilE_L$ et *pilD* [Södeberg *et al.*, 2004 ; Stone et Abu Kwaik, 1999 ; Stone et Abu Kwaik, 1998] intervient dans ce processus.

Les flagelles augmentent la probabilité de rencontre avec la cellule hôte et la capacité d'invasion mais en aucun cas ils ne constituent une adhésine [Molofski *et al.*, 2005 ; Bosshardt *et al.*, 1997].

- Au niveau génomique, le gène *rtxA,* situé au niveau du locus *enh1*, est impliqué dans l'adhésion de *L. pneumophila* aux cellules hôte de mammifères, à la formation de pores dans la membrane cellulaire et à la cytotoxocité [Cirillo *et al.*, 2001]. Le gène *laiA*, facteur de virulence, est aussi responsable de l'adhésion de *L. pneumophila* et à son invasion dans les cellules épithéliales d'alvéoles de poumons [Chang *et al.*, 2005].

- Au niveau chromosomique, trois loci de *L. pneumophila* sont impliqués dans la capacité à entrer dans les cellules hôte : *enh1*, *enh2* et *enh3* (*enhanced entry*) [Cirillo *et al.*, 2000].

1.4.2.2 Séjour intracellulaire

Après l'internalisation, la bactérie reprogramme le cycle de maturation du phagosome, notamment en interceptant le trafic vésiculaire provenant du réticulum endoplasmique rugueux (RER) ce qui permet d'inhiber la fusion phagosome-lysosome [Joshi et Swanson, 1999]. Pour permettre son séjour intracellulaire, de nombreux travaux suggèrent que *Legionella* sécrète des facteurs de virulence au sein de la cellule infectée, s'exprimant à plusieurs niveaux :

- Au niveau génomique, les gènes les plus importants du point de vue de la virulence sont les groupes de gènes *dot* (*defective in organelle trafficking*) et/ou *icm* (*intracellular multiplication*), au nombre de 25, situés au niveau de deux régions distinctes du chromosome de *Legionella* [Leclerc, 2006].

Ils codent pour un appareil de sécrétion de type IV permettant la synthèse et la translocation de molécules effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte, modulant ainsi les propriétés du phagosome et inhibant la fusion phagosome-lysosome. *Legionella* est ainsi protégée et peut se multiplier aux dépens des macrophages et des protozoaires [Thomas *et al.*, 2004 ; Cianciotto, 2001 ; Molmeret *et al.*, 2004]. Les protéines du sytème *dot/icm* impliquées dans le fonctionnement/formation de l'appareil de sécrétion sont : DotA, DotB, DotH, DotO, IcmQ, IcmR, IcmS, IcmW et IcmX [Cianciotto, 2001 ; Coers *et al.*, 2000].
Le gène *LvgA* est impliqué dans des fonctions de résistance intra et extra cellulaire de *L. pneumophila* [Edelstein *et al.*, 2003]. Le gène *pmiA* joue un rôle dans la survie intracellulaire et la réplication de *L. pneumophila* dans les cellules de macrophages et de protozoaires [Miyake *et al.*, 2005].
La dépendance de *Legionella* au fer entraîne l'existence de mécanismes permettant son acquisition. Ainsi, Viswanathan *et al.* [2000] se sont intéressés à cette dépendance et ont montré qu'un opéron double gène *iraAB* était nécessaire à l'assimilation du fer mais aussi à l'infection intracellulaire et à la virulence.
Par ailleurs, Higa et Edelstein [2001] ont mis en évidence que le gène *ptsP* était indispensable à la multiplication de *L. pneumophila* dans le compartiment intracellulaire puisque sa mutation entraîne une absence de multiplication de *L. pneumophila* dans certains types de cellules mammifères et une absence complète dans d'autres.
D'autres loci ont été identifiés mais leurs rôles sont moins bien connus : *mil* (macrophage infectivity loci), *eml* (early stage macrophage-induced locus), *mak* (macrophage killing) [Abu Kwaik et Pederson, 1996 ; Harb et Abu Kwaik, 2000].

- Au niveau protéique, la protéine de choc thermique Hsp60 (*Heat shock protein*), associée à la membrane cytoplasmique de *Legionella* est localisée à la surface de la cellule quand la bactérie est intracellulaire. L'augmentation de la synthèse de cette protéine est reliée à l'état de virulence des souches de *Legionella* et à son possible relargage dans la cellule hôte, intervenant dans le processus de l'infection [Fernandez *et al.*, 1996].

La protéine MIP (*Macrophage Infectivity Potentiator*) codée par le gène *mip* est une protéine de surface initiant l'infection intracellulaire des macrophages et des cellules épithéliales alvéolaires [Cianciotto *et al.*, 1995]. Deux rôles semblent probables pour cette protéine à travers son activité rotamase : d'abord, elle permet le repliement rapide des protéines de *Legionella* nécessaires à l'infection intracellulaire ; ensuite, elle modifierait la conformation des protéines de la cellule hôte pour les inhiber [Lo Presti, 1998].

- Au niveau enzymatique, des enzymes extracellulaires, telles que les protéases et les hémolysines, ont été impliquées comme des facteurs responsables de quelques pneumonies et manifestations extrapulmonaires dues à *Legionella* [Dowling *et al.*, 1992].

Les phosphatases, phospholipases C, protéases, zinc métalloprotéases, protéines kinases seraient impliquées dans les mécanismes de virulence de *Legionella* au sein de la cellule hôte [Dowling *et al.*, 1992]. Ces enzymes, facteurs de virulence, interviendraient en bloquant la chaîne respiratoire de la cellule hôte et en stimulant sa phagocytose [Dowling *et al.*, 1992].

1.4.2.3 Libération de *Legionella* des cellules hôtes

Les bactéries sont prisonnières de la vacuole de la cellule hôte. La membrane du phagosome éclate ce qui permet la libération de *Legionella* dans le cytoplasme de la cellule. Les bactéries peuvent en sortir en lysant la membrane cytoplasmique sous l'action du gène *rtxA* [Cirillo *et al.*, 2001], entraînant de fait la mort de la cellule hôte.

Au niveau protéique, au sein de la cellule hôte, l'épuisement en acides aminés et la production de guanosine-bipyrophosphate (ppGpp), sont les déclencheurs de la transformation de *Legionella* du stade de réplication au stade de virulence [Molofski et Swanson, 2004 ; Hammer et Swanson, 1999]. Les auteurs interprètent cette accumulation comme un signal informant les légionelles se multipliant à l'intérieur de la cellule hôte que celle-ci ne peut plus fournir de matériau nécessaire à la multiplication de *Legionella.*

Suite à la libération de *Legionella* de la cellule hôte, un phénomène de translocation bactérienne conduit à la dissémination de *Legionella* à d'autres territoires pulmonaires et la décompartimentalisation extrapulmonaire par voie hématogène [Muder et Yu, 2002].

1.4.3 Manifestations cliniques des formes de légionellose

Legionella est capable de provoquer plusieurs formes cliniques de maladies regroupées sous le terme général de légionellose. Les principales formes de légionelloses sont respectivement les atteintes respiratoires graves (la maladie du Légionnaire) et bénignes (la fièvre de Pontiac) (Tableau 1.3).

1.4.3.1 Maladie du Légionnaire

Il s'agit d'une infection pulmonaire aiguë. La période d'incubation dure de 2 à 10 jours, suivie d'un syndrome pseudo-grippal : fièvre, toux sèche, céphalées, myalgie, anorexie. Suit alors une hausse de la température, accompagnée d'une dyspnée, d'une toux virulente et éventuellement d'expectorations purulentes. Des troubles digestifs (diarrhées, vomissements) et neurologiques (délire, confusion) peuvent être retrouvés. Des signes cliniques et radiographiques d'atteinte pulmonaire avec parfois une pleurésie apparaissent alors. La pneumopathie est progressive, avec une évolution fréquente d'une condensation lobaire vers une atteinte multilobaire (surtout les cas graves). Les deux complications majeures sont une insuffisance respiratoire irréversible accompagnée d'une insuffisance rénale aiguë. Sans ces complications, l'évolution du patient atteint de légionellose est généralement favorable surtout lorsque l'antibiothérapie a été initiée précocement.

Tableau 1. 3 : Manifestations cliniques des légionelloses [Jarraud *et al.*, 2000].

	Maladie du Légionnaire	**Fièvre de Pontiac**
Symptômes	Fièvre, toux, myalgies, maux de tête, douleur thoracique, diarrhée, confusion	Syndrome grippal : fièvre, toux, myalgie
Poumon	Pneumopathie, pleurésie, abcès pulmonaire	Absence de pneumopathie et d'abcès pulmonaire
Rein	Désordres rénaux : protéinurie, hématurie, insuffisance rénale	Absence de manifestations
Foie	Peu d'anomalie de la fonction hépatique	Absence de manifestations
Tractus gastro-intestinal	Diarrhée aqueuse, douleur abdominale, vomissements, nausées	Absence de manifestations
Système nerveux central	Somnolence, délire, désorientation, confusion	Absence de manifestations

Chez de rares patients immunodéprimés atteints de la maladie du Légionnaire, la dissémination de *Legionella* à d'autres territoires pulmonaires et extra pulmonaires est observée [Muder et Yu, 2002]. Elle est appelée cliniquement légionellose extra pulmonaire [Edelstein et Meyer, 1984] et se présente sous des manifestations cliniques dramatiques.

Le site extra pulmonaire le plus fréquent est le cœur avec des manifestations sous forme de myocardite, péricardite ou endocardite sur valve prothétique. Des atteintes de l'appareil digestif par *Legionella* ont été décrites, responsables de péritonite, de colite nécrosante et de pancréatite. *Legionella* a été également impliquée, de manière concomitante à la maladie du Légionnaire, dans des cas de sinusite, pyélonéphrite et d'atteintes musculaires ou cutanées [Sire *et al.*, 1994].

La présence de *Legionella* dans des organes extra thoraciques tels que le rein [Shah *et al.*, 1992], ainsi que le foie et la rate a été démontrée notamment pour *L. pneumophila* [Watts *et al.*, 1980]. Certaines espèces dont *L. anisa* [Bornstein *et al.*, 1989] et *L. oakridgensis* [Tang *et al.*, 1985] sont capables de provoquer des pleurésies.

1.4.3.2 Fièvre de Pontiac

Découverte en 1968 lors d'une épidémie ayant eu lieu à Pontiac [Glick *et al.*, 1978], elle n'a pu être reliée à son agent pathogène qu'en 1977. Il s'agit d'une légionellose bénigne qui ne se présente pas sous la forme de pneumonie mais d'un syndrome pseudo-grippal appelé fièvre de Pontiac [Glick *et al.*, 1978].

Les symptômes déclarés par les patients sont ceux d'un syndrome pseudo-grippal : fièvre, frissons, céphalées, myalgies [Kaufmann *et al.*, 1981]. D'autres symptômes tels que dyspnée, douleurs thoraciques, vomissements et diarrhées ont été aussi décrits [Castor *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003 ; Benin *et al.*, 2002 ; Fields *et al.*, 2001]. D'ailleurs, le tableau 1.4 recense tous les symptômes cliniques développés par les patients lors des épisodes de fièvre de Pontiac. Aucune lésion n'est visible en radiographie. Dans ce cas, le pronostic vital n'est pas mis en jeu, car la guérison est spontanée [Glick *et al.*, 1978].

Toutefois, ces signes cliniques ne sont pas spécifiques de la fièvre de Pontiac et il n'existe aucune définition clinique consensuelle de la maladie à ce jour, même si des études menées dans des contextes épidémiques ont déjà permis d'orienter vers les signes cliniques impliqués dans cette maladie [Castor *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003 ; Fields *et al.*, 2001]. De même pour la durée d'incubation, les données de la littérature varient de 6 à 66 heures [Castor *et al.*, 2005 ; Fields *et al.*, 2001 ; Götz *et al.*, 2001 ; Miller *et al.*, 1993].

Une définition opérationnelle de la fièvre de Pontiac a été proposée dans le cadre de ce travail [Tossa *et al.*, 2006] et sera présentée au chapitre 5.

Tableau 1. 4 : Signes cliniques développés durant des épisodes de fièvre de Pontiac.

Source d'exposition	Symptômes	Références
Lavage à haute pression	Fièvre, frissons, asthénie, douleurs thoraciques, céphalées, myalgies, nausées, toux, dyspnée, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, rougeur oculaire avec photophobie et gorge endolorie	Castor *et al.*, 2005
Fontaine décorative	Fièvre, myalgies, céphalées, frissons, asthénie, douleur du dos, nausées, toux, vertige, crampes, diarrhée et vomissements	Jones *et al.*, 2003
Piscine	Diarrhées, vomissements, céphalées, nausées, myalgies et toux	Benin *et al.*, 2002
Piscine thermale	Myalgies, céphalées, asthénie, frissons, fièvre, toux, nausées, gorge douloureuse et dyspnée	Fields *et al.*, 2001
Tour aéroréfrigérante de climatisation	Myalgies, frissons, asthénie, fièvre et céphalées	Friedman *et al.*, 1987
Piscine	Fièvre, frissons, douleurs thoraciques, toux et nausées	Mangione *et al.*, 1985

1.4.4 Diagnostic de la maladie du Légionnaire

Les critères de diagnostic sont très précis. Un cas de maladie du Légionnaire est défini chez un patient présentant des signes de pneumopathies et/ou des caractéristiques radiologiques associés à une confirmation microbiologique d'infection à *Legionella*. Ces critères biologiques consistent en l'isolement de *Legionella* dans des prélèvements bronchiques, une immunofluorescence directe positive, une recherche d'antigène urinaire de *Legionella* positive ou une séroconversion (augmentation significative (x4) des titres d'anticorps) avec un deuxième titre minimum de 1/128.

Un cas de maladie du Légionnaire probable correspond à des signes cliniques et/ou radiologiques de pneumopathie accompagnée d'un titre unique d'anticorps élevé supérieur ou égal à 1/256 quelle que soit l'espèce [Jarraud *et al.*, 2000; Hubert *et al.*, 1997].

1.4.4.1 Types de prélèvement

Ils concernent principalement l'arbre respiratoire. La mise en culture est possible à partir de plusieurs types de prélèvement, à savoir :

- Les crachats : l'obtention de *Legionella* à partir d'un tel prélèvement établit un diagnostic de certitude de légionellose, car aucun isolat de personne saine n'a pu être obtenu.

- Les aspirations transtrachéales, bronchiques et les lavages broncho-alvéolaires (LBAs) : les prélèvements les plus conseillés pour leur plus grande probabilité d'isoler *Legionella.*
- Les exsudats pleuraux : rendement faible en culture.
- Les biopsies pulmonaires : surtout chez les patients immunodéprimés.

D'autres prélèvements ne sont pas mis en culture mais sont utilisés dans le diagnostic de légionellose :

- Les sérums : recherche d'anticorps spécifiques anti-*Legionella.*
- Les urines : détection d'antigènes de *L. pneumophila* SG1.

1.4.4.2 Examens spécifiques pour diagnostiquer la maladie du Légionnaire

1.4.4.2.1 Culture

Le prélèvement biologique réalisé sur le patient est ensemencé sur le milieu de culture spécifique à la recherche de *Legionella* : BCYE. Le succès de la culture dépend de la nature et de la qualité des prélèvements [Jarraud *et al.*, 2000]. Essentiellement, le LBA, les aspirations transtrachéales ou bronchiques et plus rarement les crachats permettent d'isoler *Legionella* par culture [Fields *et al.*, 2002]. La culture de *Legionella* bien que difficile est la méthode de choix puisqu'elle permet d'identifier le SG de l'espèce mise en cause et ainsi de la comparer à la souche environnementale. De plus, la culture a une spécificité de 100% et une sensibilité de 40 à 60% (Tableau 1.5) [Fields *et al.*, 2002]. Néanmoins, du fait du délai de diagnostic de 3 à 10 jours, cette méthodologie est de plus en plus délaissée en routine et elle est utilisée dans moins de 20% des cas (Tableau 1.6).

Tableau 1. 5: Evaluation des méthodes de diagnostic biologique de la maladie du Légionnaire [Jarraud *et al.*, 2000].

	Sensibilité (%)	**Spécificité (%)**	**Valeur prédictive positive (%)**	**Valeur prédictive négative (%)**
Culture	62	100		
Immunofluorescence directe	25-70	65		
Antigènes urinaires	56	99	86	95
Augmentation du titre des anticorps	75	95-99		
Titre unique élevé précoce	10	94	15	91
Titre unique élevé tardif	65	94	54	96

La valeur prédictive positive (VPP) se définit comme la probabilité de présenter la maladie si le test est positif. Quant à la valeur prédictive négative (VPN), elle se définit comme la probabilité de ne pas présenter la maladie si le test est négatif. La technique idéale devrait avoir des valeurs prédictives proches de 100%.

Tableau 1. 6 : Répartition des cas de maladie du Légionnaire selon les méthodes de diagnostic.

	Europe, 1999 [OMS, 2000]		**France, 2004** [Campèse *et al.*, 2005]	
	n	%	n	%
Isolement	359	*16,8*	217	*18,0*
Séroconversion	284	*13,3*	70	*5,8*
Détection antigénique urinaire	959	*44,9*	834	*69,4*
Titre unique > 256	393	*18,4*	81	*6,7*
Détection antigénique pulmonaire	34	*1,6*	0	*0*
PCR	27	*1,2*	0	*0*
Autres	8	*0,4*	0	*0*
Méthode inconnue	72	*3,4*	0	*0*
Total	**2136**	***100***	**1202**	***100***

1.4.4.2.2 Immunofluorescence directe (IFD)

Le prélèvement clinique (expectorations, aspirations trachéales, lavages bronchiques, biopsies pulmonaires ou liquide pleural) peut être analysé directement par la technique d'immunofluorescence directe (IFD). Cette technique se pratique à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui reconnaissent tous les sérogroupes connus de *L. pneumophila* pour la majorité des réactifs commercialisés. L'examen direct au microscope à fluorescence des prélèvements permet la détection rapide de *Legionella* soit une heure et demi après l'arrivée du prélèvement au laboratoire [EPA, 2001].

Le principal inconvénient de cette technique est sa faible sensibilité (25 à 70%) avec un seuil de détection de 10^4 UFC.mL^{-1} (Tableau 1.5). La relativement faible spécificité de 60 à 70 % est liée à des réactions immunologiques croisées avec certaines autres bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, Stenotrophomonas maltophilia, Bordetella pertussis, Bacteroides fragilis et Francisella tularensis* [Fields *et al.*, 2002 ; Jarraud *et al.*, 2000]. Cette technique reste limitée quant au nombre d'espèces testées et reste surtout focalisée sur la recherche de *L. pneumophila* ce qui peut expliquer sa faible utilisation lors de la détermination du diagnostic de légionellose.

1.4.4.2.3 Amplification génique

Les tests basés sur l'amplification génique sont utilisés pour détecter *Legionella* dans les prélèvements urinaires, les lavages broncho-alvéolaires et les sérums [Jarraud *et al.*, 2000]. L'amplification est effectuée actuellement sur deux gènes : le gène *mip* (permet de détecter 50 UFC dans les LBAs) [Jaulhac *et al.*, 1992] et le gène *rrf* de petite taille correspondant à l'ARN ribosomal 5S [MacDonell et Colwell, 1987].

Les avantages principaux de cette technique d'amplification sont la rapidité de la détection des *Legionella* et la possibilité de détecter les espèces de *Legionella* autres que *L. pneumophila.* Les limites de ces tests d'amplification génique sont liées à la présence d'inhibiteurs de la *Taq* polymerase dans les échantillons biologiques et aux techniques d'extraction d'ADN [Jarraud *et al.*, 2000].

Toutefois, elle est très peu utilisée en routine pour le diagnostic de légionellose, car elle n'est pas incluse dans la définition d'un cas et par le manque de standardisation dans sa réalisation.

1.4.4.2.4 Présence d'antigènes solubles urinaires

La majorité des patients atteints de la maladie du Légionnaire possède des antigènes solubles de *Legionella* dans leurs urines dès l'apparition des symptômes (3 à 4 jours) (Tableau 1.6). Ces antigènes sont détectables par méthode immunoenzymatique (ELISA) [Ruf *et al.*, 1990] basée sur un anticorps polyclonal de lapin anti-LPS, radioimmunologique (RIA) [Aguero-Rosenfeld et Eddelstein, 1988] ou par agglutination au latex. Son intérêt réside dans la rapidité de la méthode (15 minutes) et dans la facilité d'exécution.

Aucun test actuellement commercialisé ne permet de détecter tous les sérogroupes de *L. pneumophila* et toutes les espèces de *Legionella*. C'est pourquoi la sensibilité de la technique est faible (56%) si l'on considère toutes les espèces de *Legionella*. Celle-ci passe à 80% si l'on ne considère que *L. pneumophila* SG1. La spécificité de la technique est de 99%, la VPP est de 86% et la VPN de 95% (Tableau 1.5).
En théorie, l'anticorps utilisé ne permet de reconnaître que les antigènes issus de *L. pneumophila* SG1. En pratique, il est décrit des réactions croisées entre les SG4 et SG6 mais dans de très rares cas, puisque la spécificité de l'antigénurie urinaire est de 99% [Dominguez *et al.*, 1998].

La découverte récente de nouveaux antigènes urinaires dirigés contre des espèces autres que *L. pneumophila SG1* pourrait permettre d'affiner la sensibilité de la technique [Kim *et al.*, 2003]. En effet, ils permettent de détecter les espèces *L. pneumophila* SG1, SG3 et SG6 ainsi que *L. sainthelensi, L. anisa, L. oakridgensis* et *L. jordanis*.

1.4.4.2.5 Sérologie

L'immunofluorescence indirecte (IFI) est une des méthodes les plus employées [Fields *et al.*, 2002] (Tableau 1.6) et est plus sensible que certains tests ELISA [Malan *et al.*, 2003].
Les anticorps apparaissent le plus souvent une semaine après le début de l'infection, avec un pic trois à quatre semaines plus tard, la sérologie ne permet donc qu'un diagnostic tardif voire rétrospectif. La séroconversion ne peut jamais être mise en évidence malgré un diagnostic certain de légionellose [Jarraud *et al.*, 2000].
Les anticorps produits suite à une légionellose appartiennent à différentes immunoglobulines (IgM, IgA et IgG) et sont en majorité dirigés contre le LPS de la membrane externe de *Legionella*.
La sensibilité et la spécificité de la technique IFI sont seulement disponibles pour un titre élevé et sont de : sensibilité très faible (10 %) avec une VPP extrêmement basse (15%) ; spécificité de 94% avec une VPN de 91% [Freney *et al.*, 2000].

De nombreuses réactions croisées ont été décrites avec les mycobactéries, les leptospires, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Citrobacter*, *Campylobacter* et *Coxiella burnetii* [Bornstein *et al.*, 1984]. Des réactions croisées sont également rencontrées entre les différents sérogroupes et entre les différentes espèces de *Legionella* [Freney *et al.*, 2000].

Au niveau des populations saines la prévalence d'anticorps anti-*Legionella* est très faible à quasi nulle. En effet, les études sur des donneurs de sang montrent une prévalence d'anticorps anti Légionelles à des titres faibles, positifs au $1/16^{ème}$ ou $1/32^{ème}$, de 0,3% [Franzin et Scramuzza, 1995], 1,2% [Borobio *et al.*, 1987] ou 2,5% [Bornstein *et al.*, 1986].
Dans ces mêmes populations, lorsque l'on s'intéresse aux dosages sérologiques réalisés aux titres positifs à $1/64^{ème}$, la prévalence a été évaluée à 0% [Franzin et Scramuzza, 1995], 1% [Bornstein *et al.*, 1986], 1,7% [Storch *et al.*, 1979] ou au maximum 4,3% [Heudorf *et al.*, 2002].

1.4.5 Traitement de la maladie du Légionnaire

La maladie du Légionnaire reste une maladie grave ayant une mortalité non négligeable (14% en France en 2004 [Campèse *et al.*, 2005]) dépendante de la rapidité du diagnostic, de la précocité de la mise en route d'une antibiothérapie adaptée et du caractère communautaire ou nosocomial de la maladie [Edelstein, 1995 ; Heath *et al.*, 1996]. L'érythromycine est l'antibiotique historique de référence depuis l'épidémie de légionellose à Philadelphie de 1976 [Stout et Yu, 1997]. Depuis lors, plusieurs familles d'antibiotiques actifs ont été mis à disposition [Benhamou *et al.*, 2005] :

- Macrolides : clarithromycine, érythromycine, roxithromycine, spiramycine, dirithromycine, josamycine ;
- Quinolones : ofloxacine, ciprofloxacine et lévofloxacine ;
- Azalides : azithromycine ;
- Kétolides : télithromycine ;
- Rifampicine

Sur des modèles cellulaires (macrophages alvéolaires humains), l'activité équivalente des quinolones et de l'azithromycine, est cependant supérieure à celle de l'érythromycine. Les modèles animaux ont permis de conclure à la supériorité de l'azithromycine sur l'érythromycine et la clarithromycine et à l'équivalence entre télithromycine et érythromycine. Les quinolones ont une efficacité meilleure à celle de l'érythromycine et aux macrolides en général (sauf l'azithromycine). En conclusion, l'érythromycine n'est plus l'antibiotique de choix [Benhamou *et al.*, 2005].

Afin de mieux prendre en charge les patients atteints de l'infection, l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) recommande donc une antibiothérapie des légionelloses suivant deux cas (Figure 1.4) :

- En cas de forme commune : soit un macrolide, soit une quinolone ;
- En cas de forme sévère (gravité élevée) ou chez un hôte immunodéprimé : association de deux antibiotiques parmi les macrolides, quinolones et rifampicine.

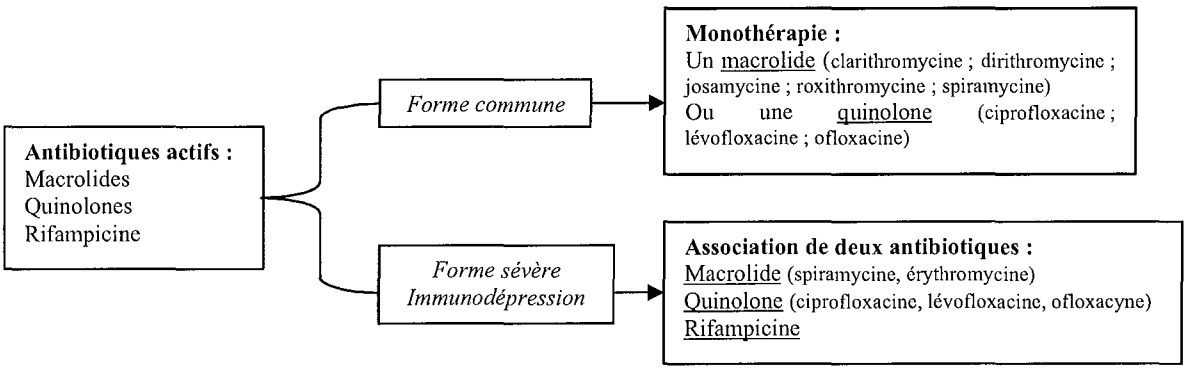


Figure 1. 4 : Antibiothérapie des légionelloses recommandées par l'AFSSAPS [Benhamou *et al.*, 2005].

La durée du traitement est de 14 à 21 jours chez les sujets immunocompétents. Elle peut être allongée à 30 jours chez les immunodéprimés ou dans les formes sévères.

2 CARACTERISATION DU DANGER

2.1 RELATION DOSE-REPONSE : CONSIDERATIONS GENERALES

2.1.1 Présentation et définition

La caractérisation du danger est une description des effets délétères sur la santé de la population exposée à un agent pathogène. Ces effets délétères peuvent se présenter sous la forme d'une infection, du développement de la maladie ou dans le cas extrême du décès.

Cette description doit dans le meilleur des cas aboutir à l'établissement d'une relation (équation 1.1) reliant les niveaux de pathogènes consommés/inhalés/contactés (= dose, N) et la probabilité (P) de développement d'infection, sa sévérité voire d'autres effets sanitaires (= réponse ou effet).

$$P = f(N) \qquad (1.1)$$

Cette relation doit pouvoir être exprimée sous une forme mathématique à l'aide de modèles qui vont décrire la fréquence et la magnitude des effets sanitaires en fonction de l'exposition à un agent pathogène. L'intérêt des modèles est bien sûr de pouvoir prédire les effets dans les zones où les données sont très parcellaires, absente voire techniquement inatteignable, c'est-à-dire les faibles doses. Mais la modélisation des relations dose-effet doit être considérée comme une description simplifiée d'interaction complexe entre des doses et des effets sanitaires.

Le but final est de quantifier la probabilité d'effet d'un individu en fonction de la dose de microorganismes à laquelle il a été exposé.

2.1.2 Modèles mécanistiques ou modèles sans seuil

En reprenant la dénomination donnée par Bonnard [2001], on peut utiliser le terme de modèle mécanistique plutôt que de modèle sans seuil. Ce modèle a été calibré en le confrontant à des données expérimentales obtenues sur des animaux ou des hommes volontaires, ou encore grâce à des données épidémiologiques. Actuellement, au niveau de l'évaluation des risques microbiologiques, la tendance est de privilégier ce type de relation dose-effet basé sur des hypothèses d'absence d'un seuil de concentration au niveau duquel le microorganisme est capable de provoquer un effet sur la population exposée.

Les modèles mécanistiques considèrent que la probabilité de développer une infection dépend d'une part de la quantité de germes avec laquelle l'hôte entre en contact et de la fraction de ces germes qui va effectivement atteindre un site d'infection. L'hypothèse considérant qu'un seul microorganisme puisse initier une infection est retenue, même si cette probabilité est faible, et conduit à la définition du modèle Exponentiel où la probabilité P d'infection d'un individu exposé à une dose d'exposition N de germes s'écrit [Armstrong, 2004] :

$$P = 1 - e^{(-rN)} \tag{1.2}$$

où r est la constante représentant la probabilité qu'une *Legionella* infecte un hôte donné.

Un autre modèle dérivé de celui-ci est également utilisé : le modèle Bêta-Poisson. Dans ce cas, la capacité d'infection de l'hôte par le pathogène est représentée par une distribution de probabilité pour tenir compte du caractère variable de ce paramètre. La formulation mathématique de cette probabilité P, suivant une loi Bêta de paramètres α et β, s'écrit alors [Armstrong, 2004] :

$$P = 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha} \tag{1.3}$$

ou encore

$$P = 1 - \left[1 + \frac{N}{N_{50}}\left(2^{\frac{1}{\alpha}} - 1\right)\right]^{-\alpha} \tag{1.4}$$

où N_{50} est la dose d'exposition conduisant à une probabilité d'infection de 50% (DI_{50}).

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

D'autres modèles mathématiques existent : weibull, logistique, probit (Tableau 1.7). Mais les modèles exponentiel et Bêta-Poisson restent cependant les plus utilisés comme modèles mécanistiques en biologie [Armstrong, 2004].

Tableau 1. 7 : Modèles mathématiques utilisés dans les relations dose-réponse.

Types de modèles	Formulation mathématique
Weibull	$P = 1 - e^{\left(-q_1 N^{q_2}\right)}$
Logistique	$P = \frac{1}{1 + e^{(q_1 - q_2 \ln(N))}}$
Probit	$P = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x} e\left(-\frac{x^2}{2}\right) dx$ avec $x = \frac{(\log N - \mu)}{\sigma}$

P : Probabilité d'infection ; N : dose de *Legionella* ; les trois modèles suivent des lois de paramètres q_1 et q_2.

2.1.3 Incertitudes liées aux modèles de relation dose-effet

Les modèles présentés ci-dessus, basés sur des données expérimentales ou épidémiologiques n'ont qu'une représentativité limitée aux conditions auxquelles ils se rapportent. En fait, les relations dose-réponse dépendent à la fois de l'agent pathogène, de l'hôte et des conditions de l'exposition. Ainsi, l'effet pathogène va dépendre du sérotype et de la souche étudiés. De plus, la virulence des souches de laboratoire est généralement différente de celles de l'environnement [Bonnard, 2001].

Le statut immunitaire et l'âge vont conditionner la réponse. Or les études expérimentales servant à définir les modèles dose-réponse sont faites, soit sur des individus sains [Philip *et al.*, 2006], soit sur des animaux [Berendt *et al.*, 1980]. Une relation établie sur des Hommes sains et de sexe masculin dans la majorité des cas ne peut donc pas en théorie et de manière rigoureuse être appliquée à une autre sous-population [Bonnard, 2001]. Pourtant, c'est sur ce type de population, plus facilement accessible, en contexte non épidémique que sont établies le plus souvent les modèles dose-réponse [Zmirou-Navier *et al.*, 2006] ce qui constitue donc une incertitude dans l'évaluation des risques microbiologiques.
Dans le même temps, la notion de population sensible n'est pas prise en compte pour l'établissement de la relation dose-réponse. D'un point de vue théorique, cette étape devrait aussi intégrer l'existence dans la population d'individus susceptibles de développer une immunité totale ou partielle à la maladie par la prise par exemple d'antibiotiques [Coleman et Marks, 1999].

2.2 Fonction Dose-Reponse : Donnees Disponibles pour *Legionella*

Actuellement, aucune relation dose-effet n'a encore pu être établie chez l'homme. Seules les données de relation dose-réponse pour *L. pneumophila* obtenue chez l'animal sont disponibles.

Toutefois, des travaux conduits suite à des épidémies de légionellose émettent bien l'hypothèse de l'existence d'une relation entre la dose d'exposition et le risque d'infection mais sans fournir de relation mathématique définissant ce lien [Brown *et al.*, 1999 ; Breiman *et al.*, 1990a ; Addiss *et al.*, 1989 ; Fraser *et al.*, 1977].

Concernant les données relatives à l'infectiosité ou à la mortalité animale dues à *Legionella*, elles ont été obtenues par différentes voies d'administration : inhalation [Berendt *et al.*, 1980], instillation nasale [Fitzgeorge *et al.*, 1983 ; Katz *et al.*, 1982], intratrachéale [Winn *et al.*, 1982] ou par injection intrapéritonéale [Fitzgeorge *et al.*, 1983]. Fitzgeorge *et al.* [1983] ont montré que l'infectiosité était dépendante de la voie d'administration. Cependant, seuls quelques travaux relatent à la fois la dose administrée et les signes d'infection associés.

Par ailleurs, les études permettant de fournir une relation entre exposition de *Legionella* et infectiosité différente aussi bien au niveau des espèces de cobayes infectées mais aussi au niveau des espèces de *Legionella* administrées [Breiman et Horwitz, 1987 ; Twisk-Meijssen *et al.*, 1987 ; Jepras *et al.*, 1985 ; Davis *et al.*, 1983 ; Fitzgeorge *et al.*, 1983 ; Meenhorst *et al.*, 1983 ; Muller *et al.*, 1983 ; Davis *et al.*, 1982 ; Baskerville *et al.*, 1981 ; Berendt *et al.*, 1980].

2.2.1 Dose Infectieuse

L'infectiosité de *Legionella* par inhalation a été étudiée uniquement sur les cobayes, placés dans des chambres expérimentales d'aérosolisation et exposés à des aérosols contaminés en *L. pneumophila* (Tableau 1.8).

Pour chaque expérience, les auteurs ont calculé, à partir des concentrations en *Legionella* cultivables des poumons *post mortem*, les doses réellement retenues en *Legionella* par les cobayes. Le tableau 1.8 met en évidence l'hétérogénéité en terme d'exposition en *Legionella* auxquels les cobayes ont été soumis : de 4 UFC à $12{,}0.10^3$ UFC *Legionella*.

Ainsi, toutes les études présentées dans le tableau 1.8, montrent que les cobayes exposés à *Legionella* aéroportée ont présenté 100% d'infection (état fébrile, perte de poids). Mais les auteurs ne se sont pas attachés à utiliser la même définition d'un état fébrile : augmentation d'1°C [Meenhorst *et al.*, 1983], température $\geq$ 40°C [Fitzgeorge *et al.*, 1983], 2 jours à une température $\geq$ 40°C [Davis *et al.*, 1982] ou encore aucune information n'est donnée quant à la définition d'un épisode de fièvre [Davis *et al.*, 1983]. De plus, la définition d'une infection par la seule mesure de la température est restreinte ; la mesure des titres en anticorps ou la présence d'antigènes urinaires auraient été aussi des marqueurs d'infection potentiels. Enfin, toutes les études portant sur la détermination de la dose infectieuse sont attachées au pouvoir infectant de *L. pneumophila* SG.1, seuls Fitzgeorge *et al.* [1983] ont travaillé de manière concomitante sur *L. pneumophila* SG.3, mais aucune étude n'a travaillé sur d'autres espèces de *Legionella*. De ce fait, aucune conclusion, à l'heure actuelle ne peut être avancée quant à la dose nécessaire, pour induire une infection. Notons toutefois que la dose d'exposition par inhalation ayant provoquée l'infection chez les cobayes reste inférieure à 10^4 UFC.

Tableau 1. 8 : Symptômes diagnostiqués chez des cobayes en fonction de la dose d'inhalation en Legionella.

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

2.2.2 Dose Létale

Pour Davis *et al.* [1983], l'exposition de $5,6.10^6$ UFC *L. pneumophila* SG $1.L^{-1}$ air à des rats et cobayes pendant 30 minutes n'a pas permis de déterminer une dose létale après 14 jours d'expérimentation. Toutefois, les rats seraient moins sensibles que les cobayes puisque 11% sont décédés contre 56% chez les cobayes. Winn [1982] confirme cette susceptibilité des cobayes supérieure à celle des rats par administration intra-trachéale de *L. pneumophila* (entre 10^6 et 10^8 UFC) : 45% des cobayes meurent de pneumonies contre 5% pour les rats. D'ailleurs, la concentration en *Legionella* dans les poumons des cobayes était plus élevée que chez les rats (4.10^4 UFC contre 1.10^3 UFC par poumon respectivement).

Si on se limite aux données obtenues par inhalation sur des cobayes, des informations sont disponibles concernant la mortalité (DL_{50}) due à *Legionella* (Tableau 1.9). Ainsi, les doses létales pour 50% de la population de cobayes varient de $3,0.10^3$ UFC à $6,3.10^5$ UFC. Cette large gamme d'amplitude (2 logs) entre les dose létales pourrait s'expliquer par le temps d'exposition à *Legionella*, les antécédents et l'âge de l'animal et le délai d'attente jusqu'au décès ; or, ces informations ne sont pas données par les auteurs et manquent donc cruellement.

Tableau 1. 9 : Létalité observée chez des animaux auxquels Legionella a été administrée.

Espèce de *Legionella*	Voie d'administration	Animal étudié	DL_{50} (UFC)	Références
L. pneumophila SG 1	Inhalation	Cobaye	$1,40.10^5$	Berendt *et al.*, 1980
	Intrapéritonéale	Cobaye	$3,00.10^6$	
L. pneumophila SGs 1 et 3	Inhalation	Cobaye	$1,00.10^4$	Fitzgeorge *et al.*, 1983
L. pneumophila SG 1	Inhalation	Cobaye	$5,00.10^4$	Dennis et Lee, 1988
L. pneumophila SG 1	Inhalation	Cobaye	$3,00.10^3$	Nowicki *et al.*, 1988
L. pneumophila SG 1	Inhalation	Cobaye	$1,00.10^4$	Mauchline *et al.*, 1994
			$2,00.10^4$	
			$2,00.10^4$	
			$6,31.10^4$	
L. pneumophila SG 1	Inhalation	Cobaye	$6,17.10^3$	James *et al.*, 1995
			$6,31.10^5$	

Les travaux de Berendt *et al.* [1980] ont même permis de mettre en évidence que la dose létale affectant 50% de la population exposée était dépendante de la voie d'administration de *Legionella*, puisque la DL_{50} est un log plus élevé par la voie intrapéritonéale que par l'inhalation.

L'existence d'expérimentations reliant l'exposition à *Legionella* et la survenue du décès sont au nombre d'une dizaine, mais aucune n'a établi une relation dose-réponse. En effet, la caractéristique des résultats obtenus empêche l'établissement de telles relations : manque d'hétérogénéité des réponses cliniques (réponse tout-ou-rien : 0 ou 100%), documentation imprécise sur le nombre d'animaux ou imprécise sur les doses d'exposition.

Plus récemment, la co-inoculation intratrachéale de *L. pneumophila* et *Hartmannella vermiformis* à des modèles murins a été réalisée. La présence du protozoaire favoriserait la multiplication de *Legionella* intrapulmonaire et la mort des souris [Brieland *et al.*, 1996].
Mais à l'heure actuelle, aucune étude n'a comparé la virulence des différentes souches de *Legionella* par inhalation, ni n'a comparé *L. pneumophila* à *Legionella spp.* afin de confirmer/infirmer les tendances épidémiologiques montrant *L. pneumophila* plus virulente que les autres espèces de *Legionella.*

2.2.3 Projection des risques pour l'Homme

Comme précisé précédemment, pour l'instant, la dose infectante chez l'homme est méconnue. Seules les doses infectantes sur des modèles expérimentaux animaux sont connus (Tableau 1.8).
Les seuils déterminés correspondent à la biomasse bactérienne nécessaire pour induire une infection *in situ* au contact de l'interface épithéliale alvéolaire de l'animal exposé. Cette concentration bactérienne est déterminée par culture à partir des poumons des animaux *post mortem.* Selon Kliment [1973] et Palm *et al.* [1956], le taux de rétention pulmonaire des particules inhalées $\leq 5\mu m$ est estimée à 50%. Ainsi, la dose d'exposition environnementale à *Legionella* dans les aérosols respirables peut être estimée approximativement au double des doses inhalées reportées dans la littérature, même si cette estimation ne prend pas en compte les pertes de la viabilité des bactéries lors de l'aérosolisation [Dennis et Lee, 1988].
Il est alors possible d'extrapoler à l'Homme les doses d'infection et de létalité à *Legionella* obtenues pour le cobaye. Tout d'abord, concernant la dose d'infection, une seule étude [Muller *et al.*, 1983] a proposé, à partir de plusieurs concentrations d'exposition en *Legionella* une relation dose-effet, c'est donc cette étude qui sera retenue pour déterminer la dose infectante (D.I.).
Quant aux données de doses létales, nous disposons de plusieurs études [Fitzgeorge *et al.*, 1983 ; Baskerville *et al.*, 1981 ; Berendt *et al.*, 1980], pour lesquelles Armstrong [2004] a déterminé que seules les données de Baskerville *et al.*, [1981] étaient applicables en modèles mathématiques : Exponentiel et Bêta-Poisson (*cf.* § 2.1.2) ; les données provenant des autres travaux ne s'ajustant sur aucun des modèles mathématiques existants.

A partir de ces constats, Armstrong [2004] a alors entrepris l'extrapolation des données, obtenues pour le cobaye, à l'être humain, en prenant en compte les résultats des modèles Bêta-Poisson, caractéristiques des extrapolations aux faibles doses. Ainsi, il a estimé, de manière théorique, que les doses inhalées retenues à risque chez l'Homme sont de : DI_{50} = 12 UFC ; $DL_{50} = 6{,}3.10^3$ UFC.

Considérant que seul 50% de l'aérosol est retenu au niveau pulmonaire, les niveaux d'exposition réellement à risque sont estimés au double de ceux présentés ci-dessus. Bien sûr, il s'agit, ici, d'une toute première approche de l'estimation d'une relation dose-effet chez l'homme, purement théorique et méritant d'être confirmée : en effet, la DI_{50} à 24 UFC pour l'homme est encore plus faible que certaines observées pour les cobayes (Tableau 1.8), dans des conditions extrêmes d'expérimentations, de même pour la dose létale ! Par ailleurs, le transfert des données du cobaye à l'homme a été réalisé sans considérer de facteur d'incertitude. De plus, cette extrapolation approximative a omis de prendre en compte plusieurs paramètres : caractéristiques anatomiques de l'individu, facteurs de risque (tabagisme), survie de l'aérosol avant inhalation, volume réellement inhalé. Par ailleurs, une étude récente [Mathieu *et al.*, 2006] a mis en évidence pour la première fois, les doses mesurées de *Legionella* aéroportée en contexte épidémique : de $3{,}3.10^2$ à $5{,}4.10^3$ UFC.m^{-3} air ; ces concentrations sont bien supérieures aux DI_{50} proposées par Armstrong [2004]. L'extrapolation des doses infectieuses à l'Homme mérite donc d'être étudiée de manière plus poussée.

2.3 Facteurs de Susceptibilite de l'Hote a *Legionella*

Le risque de contracter une légionellose (maladie du Légionnaire ou fièvre de Pontiac) pour un individu lorsqu'il inhale la quantité nécessaire et suffisante de *Legionella* dépend des caractéristiques de l'exposition et de l'état de santé de la personne exposée.

2.3.1 Facteurs de risque de la maladie du Légionnaire

Le Conseil Supérieur d'Hygiène Public de France a défini en 2005 [CSHPF, 2005] deux catégories de population à risque pour l'exposition à *Legionella* :

- Les « personnes à haut risque » représentées par les immunodéprimés sévères ou non après soit une transplantation ou une greffe d'organe soit par une corticothérapie prolongée (0,5 mg.kg^{-1} de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente à haute dose (supérieure à 5 mg.kg^{-1} pendant plus de 5 jours).

- Les « personnes à risque » sont les personnes ayant un système immunitaire fortement diminué du fait, soit d'une pathologie (hémopathie maligne, leucémie, cancers surtout broncho-pulmonaires) soit d'un traitement immunodépresseur.

Dans le cas particulier de patients atteints par le VIH, la maladie du Légionnaire est une pathologie intercurrente possible, mais relativement rare [Fields *et al.*, 2002].

D'autres facteurs favorisants associés à la maladie du Légionnaire ont été retrouvés dans la littérature, à savoir :

- L'âge avancé [Marston *et al.*, 1994] : la maladie du Légionnaire est rare chez les personnes de moins de 20 ans : un cas déclaré en France en 2004 [Campèse *et al.*, 2005].
- Le sexe masculin [Marston *et al.*, 1994 ; Campèse *et al.*, 2005]
- Le tabagisme [Marston *et al.*, 1994 ; Campèse *et al.*, 2005]
- Le diabète [Marston *et al.*, 1994 ; Campèse *et al.*, 2005]
- Les antécédents d'une intervention chirurgicale récente [Stout et Yu, 1997]
- Les pathologies chroniques cardiaques, pulmonaires ou l'insuffisance rénale [Marston *et al.*, 1994]
- L'alcoolisme n'est pas toujours retrouvé dans la littérature.

Chez certains sujets atteints de maladie du Légionnaire, aucun facteur favorisant n'a été répertorié [Campèse *et al.*, 2005; CSHPF, 2005].

2.3.2 Facteurs de risque de la fièvre de Pontiac

La fièvre de Pontiac est une pathologie à *Legionella*, beaucoup moins connue et surveillée que la maladie du Légionnaire ; de ce fait, les données de la littérature faisant état des facteurs de risque de la fièvre de Pontiac sont rares.

Par ailleurs, ces quelques données tendent plutôt à montrer que les facteurs de risques connus pour la maladie du Légionnaire ne s'appliquent pas à la fièvre de Pontiac. En effet, ni l'âge [Friedman *et al.*, 1987 ; Mangione *et al.*, 1985] et ni le genre n'ont d'influence sur le survenue de la fièvre de Pontiac [Götz *et al.*, 2001 ; Fenstersheib *et al.*, 1990 ; Friedman *et al.*, 1987].

Concernant les pratiques tabagiques, rien ne permet d'affirmer à l'heure actuelle qu'elles constituent ou non un facteur de risque à la fièvre de Pontiac du fait de la contradiction à ce sujet dans la littérature [Huhn *et al.*, 2005 ; Benin *et al.*, 2002 ; Götz *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 1987 ; Mangione *et al.*, 1985].

En complément de la susceptibilité des individus, qui constitue un des facteurs favorisant l'acquisition d'une légionellose, d'autres facteurs interviennent, comme la proximité des installations contaminées et la durée de l'exposition aux aérosols contaminés, la concentration bactérienne, l'aérosolisation des bactéries sous forme de particules respirables de taille inférieure à 5 µm et le pouvoir pathogène de la souche [CSHPF, 2001].

3 CARACTERISATION DES EXPOSITIONS

L'évaluation de l'exposition vise à caractériser qualitativement et quantitativement le contact entre les populations et l'agent nocif, ici la bactérie *Legionella*.

Pour se faire, les moyens existants pour détecter et analyser *Legionella* à la fois dans l'eau et les aérosols sont présentés. Ils permettent d'évaluer les niveaux de contamination en *Legionella* dans l'environnement (§3.2). Enfin, les moyens de surveillance et de gestion d'une éventuelle contamination environnementale à *Legionella* sont présentés en dernière partie de paragraphe.

3.1 DETECTION DE *LEGIONELLA* DANS L'ENVIRONNEMENT

La détection environnementale de *Legionella* fait partie de la surveillance microbiologique du milieu hydrique ; les modalités de cette surveillance dépendent de la nature ou de l'usage de l'eau (eau chaude sanitaire, eau de tour aéroréfrigérante, eau thermale, ...). Elle est conseillée dans les lieux où se trouvent des personnes à risque (établissements thermaux, hôpitaux, ...). Par ailleurs, cette détection est utile lors d'épidémies ou d'enquêtes épidémiologiques afin d'identifier la source de contamination.

Les réglementations sur la gestion du risque légionelles décrivent à la fois le prélèvement d'eau, non développé dans ce manuscrit, et l'analyse par culture des échantillons d'eau [AFNOR, 2003]. Les modalités de prélèvement des aérosols qui sont moins bien connues, non standardisées et plus novatrices dans la problématique des légionelles ont retenu notre attention et seront abordées, ainsi que les techniques d'analyses existantes afin de détecter *Legionella* à la fois dans l'eau et l'aérosol.

3.1.1 Collecte des bioaérosols

Il s'agit de présenter ce qu'est un aérosol et plus précisément un bioaérosol, ainsi que les techniques utilisées pour sa collecte.

3.1.1.1 Définition d'un bioaérosol

Un aérosol désigne tout ensemble de particules solides ou liquides, ou les deux, en suspension dans un milieu gazeux. Les particules sont conventionnellement considérées en suspension si leur vitesse de chute maximale n'excède pas 25 $cm.s^{-1}$ [Lighthart et Mohr, 1994]. Un aérosol désigne donc tout type de particules en suspension telles que fumées, poussières ou vésicules.

Le terme bioaérosol désigne un aérosol composé de particules d'origine biologique. Par conséquent, un bioaérosol microbien contient des microorganismes comme des virus, bactéries, champignons, protozoaires ou encore des algues. C'est un terme restrictif car il tient compte de la nature biologique de l'aérosol et notamment de ses propriétés (viabilité, caractère infectieux, allergénique, ...). Les bioaérosols peuvent contenir des particules solides ou liquides et peuvent aller d'une taille d'un simple microorganisme à de larges gouttelettes de liquide. Ces aérosols humides peuvent contenir plusieurs microorganismes, grains de pollens, agglomérés et/ou des microorganismes attachés à des particules de débris, d'écailles de peau, et/ou à des particules du sol [Lighthart et Mohr, 1994].

Le diamètre aérodynamique des aérosols biologiques est compris entre 0,07 et 100 µm (Figure 1.5) ; au-delà de cette taille, les particules se déposent rapidement par sédimentation.

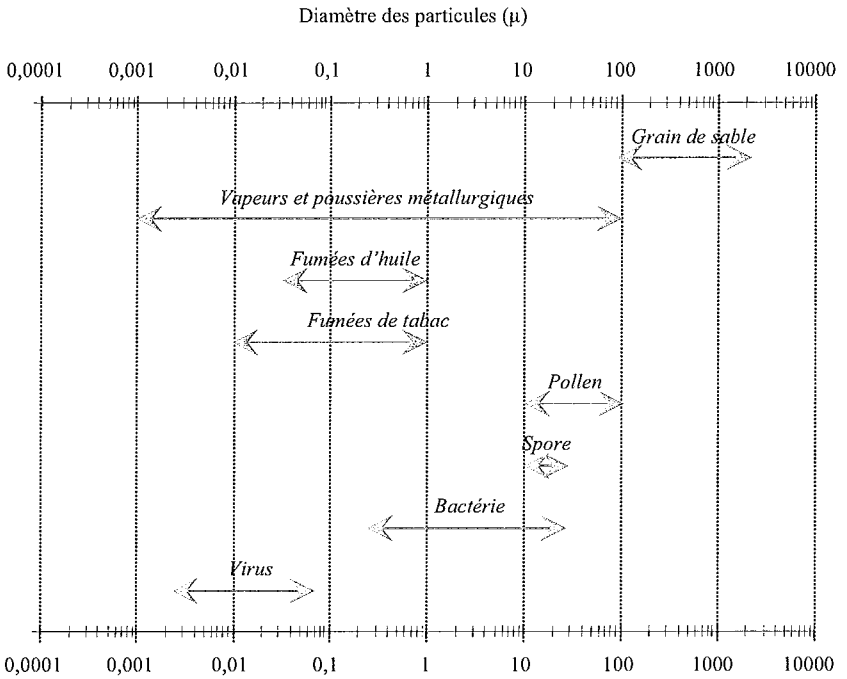


Figure 1. 5 : Tailles des particules d'aérosols [adapté de Lighthart et Mohr, 1994].

3.1.1.2 Outils utilisés pour le prélèvement de bioaérosols

La collecte des aérosols requiert des méthodes capables de séparer et de collecter des particules de l'air ambiant. L'impaction sur milieu solide, la filtration et l'impaction sur milieu liquide sont les trois principaux principes de collecte capables d'accomplir cette séparation pour l'échantillonnage du bioaérosol [Jensen *et al.*, 1994]. L'appareil utilisé pour la collecte de l'aérosol bactérien est appelé biocollecteur.

3.1.1.2.1 Impaction sur milieu solide

L'impaction consiste à interposer une surface solide (support de collecte) sur le trajet du flux d'air aspiré. L'air balaie cette surface et les particules, entraînées par leur inertie, sont projetées sur le support [Jensen *et al.*, 1994].

L'impacteur idéal a un seuil de coupure au niveau duquel toutes les particules plus grandes qu'une certaine taille aérodynamique sont collectées et toutes les particules plus petites que cette taille passent au travers du support de collecte. En pratique, un impacteur peut être défini par le nombre de Stokes, Stk_{50}, qui correspond à 50% d'efficacité de collecte ; sachant que les effets de type - perte sur les parois, rebond/réentraînement des particules - ne sont pas pris en considération par cette approche théorique de la collecte.

Il suppose que la masse de particules plus larges que le diamètre de coupure (d_{50}) qui passe à travers le support de collecte est égale à la masse de particules plus petites que le d_{50} qui ont été collectées. Par conséquent, le d_{50} est le diamètre aérodynamique au-dessus duquel l'efficacité de collecte de l'impacteur approche les 100% [Jensen *et al.*, 1994].
Un biocollecteur de type impacteur sur milieu gélosé est composé d'une grille et d'un support de collecte. Les grilles de l'impacteur peuvent être composées soit de trous soit de fentes. Le support de collecte peut consister en une plaque, ou un milieu de culture contenu dans une boîte de Pétri [Jensen *et al.*, 1994].

L'avantage majeur de l'impaction sur milieu solide est sa mise en oeuvre simple et peu coûteuse [Nesa *et al.*, 2001]. Mais son utilisation est limitée car cette technique ne peut être utilisée directement pour la détection de *Legionella* par PCR, à moins de remplacer le milieu solide de collecte par un liquide ou un gel [Pascual *et al.*, 2001]. Les boîtes de Pétri sont souvent saturées lors de prélèvement dans des milieux ayant une forte pollution microbienne ou lors de prélèvements de grands volumes d'air et l'impaction rend impossible toute dilution ou concentration du milieu de recueil puisque le prélèvement est effectué directement sur le milieu de collecte. *Legionella* dont la croissance est beaucoup moins rapide que les bactéries rencontrées usuellement dans l'air, *Bacteroïdes* ou *Aeromonas*, par exemple, sont difficilement mises en évidence par cette technique, même en utilisant un milieu sélectif contenant des antibiotiques, notamment pour limiter la prolifération des moisissures de l'air. La difficulté de détecter *Legionella* par la méthode d'impaction a également été attribuée à la dessiccation de ces bactéries ainsi qu'au traumatisme de l'impaction qui altérerait la cultivabilité de *Legionella* [Predicala *et al.*, 2002 ; Bollin *et al.*, 1985].

3.1.1.2.2 Filtration

Dans le principe de filtration, l'air est aspiré à travers un filtre de forme membranaire ou fibreuse (comme la fibre de verre). Les filtres constitués d'une membrane peuvent avoir une variété de taille de pore due à la nature de cette membrane, constituée de polymère tel que l'ester ou l'acétate de cellulose, le chlorure de polyvinyl ou le polycarbonate [Jensen *et al.*, 1994]. Les membranes en polycarbonate, qui ont une rigidité faible, doivent être utilisées avec un support pad.
Une fausse idée reçue consiste à dire que seules les particules de l'air plus larges que la taille des pores du filtre sont retenues. Or, le déplacement de particules se produit par collision et attachement des particules à la surface du filtre ou de la membrane [Jensen *et al.*, 1994]. Ainsi, les particules plus petites que la taille de pores peuvent être collectées efficacement. Les filtres utilisés pour les échantillonnages de bioaérosols peuvent avoir des diamètres de pore de 0,01 à 10 µm.

L'efficacité de collecte des filtres est dépendante de la nature du filtre. Pour les filtres en fibre de verre, l'efficacité de collecte est fonction de la vitesse de visée (c'est à dire la vitesse d'air à travers la surface

du filtre). Pour les particules de moins de 1 µm, l'efficacité globale diminue avec l'augmentation de la vitesse de visée. Pour les particules de plus de 1 µm, l'efficacité de collecte du filtre est supérieure à 99%. Pour les membranes, l'efficacité globale est d'environ de 100% pour les particules plus larges que la taille de pore [Jensen *et al.*, 1994].
Le biocollecteur basé sur le principe de la filtration consiste en une pompe aspirante reliée à une cassette servant de support au filtre.

La filtration, contrairement à l'impaction, est adaptée aux ambiances fortement contaminées [Eduard *et al.*, 1990] puisqu'il est possible de réaliser une série de dilutions de l'échantillon. Toutefois, si le filtre est placé directement après le prélèvement sur une boîte de Pétri contenant un milieu de culture, les agrégats de bactéries seront aussi comptés comme une seule colonie entraînant une sous-estimation de la contamination de l'air. Pour palier ce problème, Lighthart et Mohr [1994] proposent de placer le filtre dans une solution de lavage et d'inoculer des séries de dilutions de cette solution sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture approprié. Les manipulations supplémentaires du filtre parfois nécessaires [Görner *et al.*, 2006] - l'extraction de l'échantillon dans un diluant (soumis ou non aux ultrasons), suivie par une série de dilutions, puis un éventuel marquage ADN (avec/sans fluorochrome) ou anticorps pour la visualisation microscopique, suivie du rinçage de la solution de marquage en excédent - constituent un facteur supplémentaire d'erreurs. A notre connaissance, aucune publication ne fait mention de cette technique pour la détection de *Legionella* dans un aérosol.

3.1.1.2.3 Impaction en milieu liquide

L'impaction en milieu liquide permet, comme son nom l'indique, l'échantillonnage des aérosols dans un liquide [Juozaitis *et al.*, 1994]. Le biocollecteur utilisé est appelé impinger et plusieurs appareils basés sur ce principe de collecte sont commercialisés comme les impingers Greenberg-Smith, AGI-30, SKC, ... [Jensen *et al.*, 1994]. Ces appareils, d'un coût élevé, sont intégralement composés en verre, donc de mise en œuvre délicate en routine sur le terrain.

Un impinger est composé d'un tube d'entrée courbé sensé simuler la collecte de particules dans le passage nasal [Jensen *et al.*, 1994]. L'impinger est un des appareils utilisés pour étudier la potentielle infection respiratoire due à des microorganismes aériens.
La d_{50} théorique des impingers est de 0,3 µm [Jensen *et al.*, 1994 ; Cown *et al.*, 1957] et la taille des particules pouvant être collectées peut atteindre 20 µm.
Le milieu liquide de collecte semble influencer la viabilité de *Legionella* et notamment sa capacité à être cultivée ultérieurement [Hambleton *et al.*, 1983]. Il peut être composé d'eau distillée, d'une solution saline, de la solution de Page, de BMPA, GPMA, BYE, PBS, [Hambleton *et al.*, 1983 ; Ishimatsu *et al.*, 2001] utilisés seuls ou avec des additifs comme les protéines ou les anti-mousses.

En effet, la prévention de mousse et la perte du liquide de collecte pourrait réduire les dommages sur les cellules bactériennes [Jensen *et al.*, 1994].

L'impaction sur milieu liquide semble être la méthode la plus sensible de prélèvement pour *Legionella*, mais est d'un emploi plus difficile [Breiman *et al.*, 1990b], puisque le recueil est effectué dans un milieu liquide et que l'instrumentation en verre est fragile. L'avantage de cette technique est qu'elle permet des dilutions ou des concentrations des microorganismes collectés en fonction de la pollution microbienne présente dans l'atmosphère, elle est donc adaptée aux ambiances fortement contaminées.

3.1.2 Méthodes d'analyse et d'identification de *Legionella*

3.1.2.1 Méthodes phénotypiques

3.1.2.1.1 Méthode par culture

Malgré le développement des techniques de biologie moléculaire, la méthode normalisée de culture reste toujours la méthode de référence. Il existe actuellement trois normes disponibles pour la recherche de *Legionella* dans l'eau qui servent aussi à leur détection dans l'air puisque aucune méthode spécifique à *Legionella* aéroportée n'existe :

- la norme ISO 11731-2:2004, Detection and enumeration of *Legionella*, pour des eaux à faible teneur en bactéries [AFNOR, 2004]
- la norme AFNOR, NF T 90-431, Recherche et dénombrement de *Legionella spp.* et de *Legionella pneumophila* [AFNOR, 2003]
- la norme ISO 11731:1998, Recherche et dénombrement des *Legionella* [AFNOR, 1998].

Ces normes préconisent l'utilisation de deux milieux de référence pour la détection des *Legionella* dans l'eau : le milieu BCYEα (extrait de levure, charbon actif, L-cystéine, α-cétoglutarate et pyrophosphate ferrique) et le milieu GVPC (Glycine, Vancomycine, Polymyxine B, Cycloheximide). Le milieu GVPC a la même composition que le milieu BCYEα auquel est ajouté une solution d'antibiotiques et de glycine afin d'inhiber la croissance des microorganismes interférants.

Les exigences nutritionnelles de *Legionella* et leur croissance lente sur les milieux utilisés ont entraîné la multiplicité des milieux existants pour leur détection. Ainsi, plusieurs milieux, qui diffèrent par la nature des antibiotiques ajoutés ont été aussi utilisés :

- MWY (Modified Wadowsky-Yee medium) : milieu BCYEα rendu sélectif par l'addition de glycine et d'antibiotiques (polymixine B, vancomycine et anisomycine) [Edelstein, 1982] ;

- BMPAα : milieu BCYEα supplémenté en antibiotiques (céfamandole, Polymixine B et anisomycine) [Edelstein, 1981] ;

- DGVP : milieu supplémenté en glycine et antibiotiques (vancomycine et polymixine) [Ta *et al.*, 1995] ;

- CCVC (Céphalotine, Colistine, Vancomycine, Cycloheximide) : milieu sélectif par l'addition d'antibiotiques [Kusnetsov *et al.*, 1994].

Edelstein [1982 ; 1981] a comparé tous les milieux de culture précédemment décrits et a montré que le milieu de culture BCYEα avait une meilleure efficacité de détection de *Legionella* que les autres.

La méthode de culture, simple, sensible et spécifique (100%), reste la méthode de référence dans l'eau, mais par défaut, aussi dans l'air. Par la cultivabilité des espèces, elle nous donne une information sur la viabilité d'une fraction des *Legionella*. Mais, après une longue période d'incubation (8 à 10 jours) l'obtention des résultats est tardive. La présence de flore interférente peut empêcher la détection et la quantification de *Legionella* des échantillons environnementaux (eau et aérosol). De plus, cette technique ne peut détecter les bactéries viables non cultivables [Hussong *et al.*, 1987] ou actives et non cultivables [Lebaron *et al.*, 2001], état pouvant être induit par les stress environnementaux [Hussong *et al.*, 1987] et notamment les stress engendrés par l'aérosolisation des bactéries (cf § 1.2.2.3 de ce chapitre).

3.1.2.1.2 Immunofluorescence directe (IFD)

L'IFD permet de visualiser directement *Legionella* des échantillons environnementaux soit après concentration soit à partir de suspensions bactériennes réalisées à partir de colonies obtenues par culture.

Cette technique permet la mise en évidence et l'identification des *Legionella* par utilisation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux marqués : l'échantillon (concentrat ou suspension) est fixé sur une lame puis recouvert d'anticorps conjugués à un marqueur fluorescent (FITC : isothiocyanate de fluorescéine) et spécifiques d'antigènes de *Legionella*. Les anticorps conjugués se lient aux antigènes de *Legionella* et les complexes antigène-anticorps sont visibles au microscope à fluorescence, après excitation sous lumière U.V..

La simplicité de cette technique est accrue par les nombreux kits commerciaux qui proposent soit des anticorps monoclonaux soit polyclonaux, pour détecter rapidement *L. pneumophila* (tous SGs confondus ou un SG particulier) ou *L. sp.* (plusieurs espèces ou une espèce cible).

L'IFD est une technique rapide (moins de 4 heures) permettant la détection des bactéries non cultivables si elle est utilisée directement sur les échantillons liquides [Lye *et al.*, 1997 ; Palmer *et al.*, 1993]. Cependant, des réactions croisées sont possibles avec d'autres espèces bactériennes de l'environnement [Palmer *et al.*, 1993] (*Staphylococcus aureus* et *Lactobacillus brevis*).

3.1.2.1.3 Agglutination au latex

L'agglutination au latex est réalisée à partir de colonies obtenues par culture. Ce test utilise des anticorps spécifiques anti-*Legionella* ou anti-*L. pneumophila* obtenus chez le lapin par le protocole d'hyperimmunisation de Lancefield [Reyrolle *et al.*, 2004] et adsorbés sur des particules de latex. En

présence des antigènes de paroi de *Legionella*, les particules de latex sensibilisés agglutinent et forment des agrégats bien visibles.

C'est une méthode rapide (1 à 2 min.) qui permet une identification simple et précise des espèces et SGs de *Legionella*. En effet, son efficacité d'identification des sérogroupes de *Legionella* est trois fois plus élevée comparée à la technique d'immunofluorescence directe [Reyrolle *et al.*, 2004]. Toutefois, elle ne permet pas de palier la non détection de bactéries viables non cultivables puique cette étape est réalisée sur des colonies bactériennes. Des kits commerciaux simples d'utilisation existent mais là encore des réactions croisées entre espèces de *Legionella* peuvent se produire.

3.1.2.2 Méthodes génotypiques

La biologie moléculaire a permis, grâce à l'application directe de sondes d'acides nucléiques marqués, de détecter et d'identifier directement des gènes ou des fragments de gènes spécifiques permettant la mise en évidence des bactéries à croissance lente ou difficile.

3.1.2.2.1 La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) consiste à amplifier une séquence oligonucléotidique. Cette séquence est comprise entre deux séquences sur lesquelles s'hybrident des amorces de séquence connues. Cette amplification est rendue possible grâce à une enzyme (polymérase).

Afin de permettre une amplification, trois étapes sont nécessaires :

- Une étape de dénaturation des 2 brins complémentaires de l'ADN entraînant la linéarisation du double brin hélicoïdal qui compose l'ADN et la séparation des deux brins.
- Une étape d'hybridation des amorces spécifiques du fragment à amplifier sur leur séquence complémentaire de brins d'ADN matrice.
- Une étape d'extension : les oligonucléotides ainsi hybridés servent d'amorces à l'ADN polymérase qui va synthétiser de nouveaux brins, copie des brins matrices. Cette étape permet de synthétiser le fragment d'ADN recherché.

Ces trois étapes sont répétées à chaque cycle d'amplification. Cette technique permet d'obtenir le fragment d'ADN recherché en grande quantité (10^6) ce qui permet de les visualiser aisément sur un gel d'agarose par électrophorèse, ou par hybridation avec une sonde marquée ou de réaliser des clonages ou séquençages.

La quantité d'ADN génomique présent dans une cellule de *Legionella* est d'environ 4 fg pour un génome d'environ 3,9 Mb [Maiwald *et al.*, 1994].

Plusieurs techniques de PCR ont été développées en utilisant des gènes cibles différents. L'amplification du gène *mip,* codant pour une protéine facilitant la pénétration de *Legionella* dans le macrophage et intervenant dans sa survie intracellulaire, a été tout d'abord initiée.

Il présente donc l'intérêt d'être spécifique à *Legionella*. Un couple d'amorces, L*mip*920 et L*mip*1548, en position 942 et 1548 sur le gène *mip* a été utilisé de façon à amplifier un fragment de 650 pb [Mahbubani *et al.*, 1990]. Un autre couple d'amorces, Lpm1 et Lpm2, permet d'amplifier une séquence de 630 pb [Riffard *et al.*, 1996]. Cette technique a été utilisée pour la détection de *Legionella* dans l'eau, en incluant les *Legionella* viables et non cultivables [Bej *et al.*, 1991].
Afin d'améliorer la sensibilité de la PCR, les amorces peuvent aussi être dirigées contre le gène codant l'ARNr. De nombreuses amplifications par PCR basées sur les gènes de l'ARNr ont été testées sur *Legionella* [Declerck *et al.*, 2003 ; Mahbubani *et al.*, 1990]. Elles comportent des amplifications notamment du gène *rrf* (ARNr 5S) et du gène *rrs* (ARNr 16S) codant pour des régions très conservées au sein du genre *Legionella*.

La technique PCR présente de nombreux avantages comme la détection spécifique de *Legionella* même si elle est en présence d'une flore interférente abondante [Palmer *et al.*, 1993] ou si elle est en très faible quantité dans l'eau [Bej *et al.*, 1990]. Par ailleurs, c'est une méthode rapide dont les résultats sont disponibles en moins de 48 heures. Enfin, elle permet la détection de la totalité des bactéries cibles. Néanmoins, la technique de PCR ne permet pas de quantifier *Legionella* dans les échantillons environnementaux ni de donner d'informations sur son état physiologique.

3.1.2.2.2 La nested et semi-nested PCR

La PCR interne ou nested PCR est basée sur la réalisation de deux PCR successives destinées à amplifier spécifiquement une séquence d'ADN précise. Après une 1ère PCR réalisée avec un couple d'amorces dites externes, le produit est réamplifié au cours d'une 2nde PCR en utilisant un autre couple d'amorces dites internes. Ce couple d'amorces internes, ou « nested primer set » est localisé à l'intérieur de la zone amplifiée pendant la 1ère PCR [Xu, 1993]. Concernant la semi-nested PCR, le deuxième couple d'amorces dites semi-internes est constitué d'une amorce du couple de la 1ère PCR et d'une amorce interne.
Les amorces utilisées lors de nested ou semi-nested PCR sont identiques à celles utilisées lors de la réalisation d'une simple PCR, à savoir l'amplification de séquences sur le gène *mip* ou sur les gènes de l'ARNr comme spécifié auparavant.
Le recours à ces PCR spécifiques s'est imposé du fait d'un besoin d'augmenter la spécificité et la sensibilité des produits d'amplification obtenus, compte-tenu de la matrice environnementale complexe mais aussi par le besoin de méthodes de détection de plus en plus rapides.
La haute sensibilité de ces techniques a été évaluée sur des échantillons d'eau de tours aéroréfrigérantes et permet de fixer une limite de détection à 1 fg d'extrait d'ADN de *Legionella*. A l'heure actuelle, ces nouvelles techniques de biologie moléculaire ont permis de détecter *Legionella* à la fois dans les échantillons d'eau potable [Miyamoto *et al.*, 1997 ; Catalan *et al.*, 1994], d'eau de tours aéroréfrigérantes

[Horng *et al.*, 2006] et dans les échantillons d'aérosol à la fois au niveau d'usines de traitements d'eaux usées et de produits chimiques industriels [Pascual *et al.*, 2001].

Nested et semi-nested PCR offrent les mêmes avantages que la technique classique de PCR en plus d'une détection encore plus rapide (4-8h) du fait de l'absence de confirmation de spécificité d'amplification par hybridation. Néanmoins, les risques de contamination par les produits amplifiés sont plus importants que lors d'une PCR classique du fait de manipulations supplémentaires des échantillons.

3.1.2.2.3 La technique de PCR en temps réel

La technique de PCR en temps réel permet de déterminer qualitativement et quantitativement le taux de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires et les eaux de tours aéroréfrigérantes. Aucune donnée, à l'heure actuelle, ne fait état de la détection de *Legionella*, par PCR en temps réel, sur d'autres types d'eau, du fait de la possible présence d'inhibiteurs à l'amplification de l'ADN durant la PCR.
En pratique, les échantillons d'eau sont concentrés soit par filtration soit par centrifugation afin d'extraire l'ADN de *Legionella*. Une technique de PCR avec un couple d'amorces permet d'amplifier soit des fragments du gène *mip* soit de l'ARNr 16S. Des sondes spécifiques s'hybrident avec les fragments amplifiés et sont excitées par voie lumineuse ce qui permet de visualiser et de quantifier les fragments amplifiés en fonction du nombre de cycles d'amplification au sein du thermocycleur.

Cette technique a permis de détecter et quantifier *Legionella* dans des échantillons d'eau alors que la culture ne la mettait pas en évidence [Wellinghausen *et al.*, 2001]. La comparaison de cette technique entre laboratoires est complexe puisqu'elle fait intervenir à la fois une homogénéité entre les amorces, mais aussi l'appareil d'amplification utilisés. C'est pourquoi, dans la littérature, les limites de détection et de quantification ne sont pas comparables comme le montrent les travaux de Levi *et al.* [2003] proposant un seuil de détection à 800 cellules.L^{-1} alors que l'équipe de Wellinghausen [2001] a évalué la limite de quantification à 230 *Legionella*.L^{-1}.
De même, une étude récente a montré que deux types de PCR réalisées dans les mêmes conditions d'expérimentation mise à part le choix des amorces, présentaient des limites de détection d'un facteur 20 d'écart [Joly *et al.*, 2006].
La normalisation récente de la technique de détection d'ADN de *Legionella* par PCR quantitative en temps réel [AFNOR, 2006] devrait répondre à ces problèmes (multitude d'appareils PCR, utilisation ou non de kits, ...) puisqu'elle vise à définir des critères afin d'évaluer la sensibilité, la spécificité, la répétabilité, le rendement, les limites de détection et de quantification ainsi que la justesse de la quantification en fonction de l'étalonnage.

Du fait de sa grande simplicité de mise en oeuvre et de son automatisation, la PCR en temps réel permet d'obtenir la concentration en *Legionella* dans un échantillon d'eau en moins de cinq heures [Levi *et al.*,

2003] tout en évitant au maximum les risques de contamination. Toutefois, cette technique ne permet pas de distinguer si les bactéries sont mortes ou viables.

A l'heure actuelle, aucun travail ne fait mention de l'application de la PCR en temps réel sur des échantillons d'aérosols. En outre, l'équivalence entre le nombre d'unités génome donné par la PCR en temps réel et le nombre d'UFC n'est pas encore établie même si une étude récente avait tenté de la mettre en évidence [Joly *et al.*, 2006].

3.1.2.2.4 Hybridation in situ avec des sondes fluorescentes (FISH)

Elle repose sur la fixation et l'appariement d'une sonde nucléique complémentaire d'une séquence d'acide nucléique cible (d'ADN ou d'ARN) au sein de la cellule bactérienne. La sonde, spécifique à *Legionella*, est marquée par un fluorochrome (carbocyanine, dérivés de fluorescéine et rhodamine) qui permet la détection de la cible au microscope par épifluorescence (Figure 1.6).

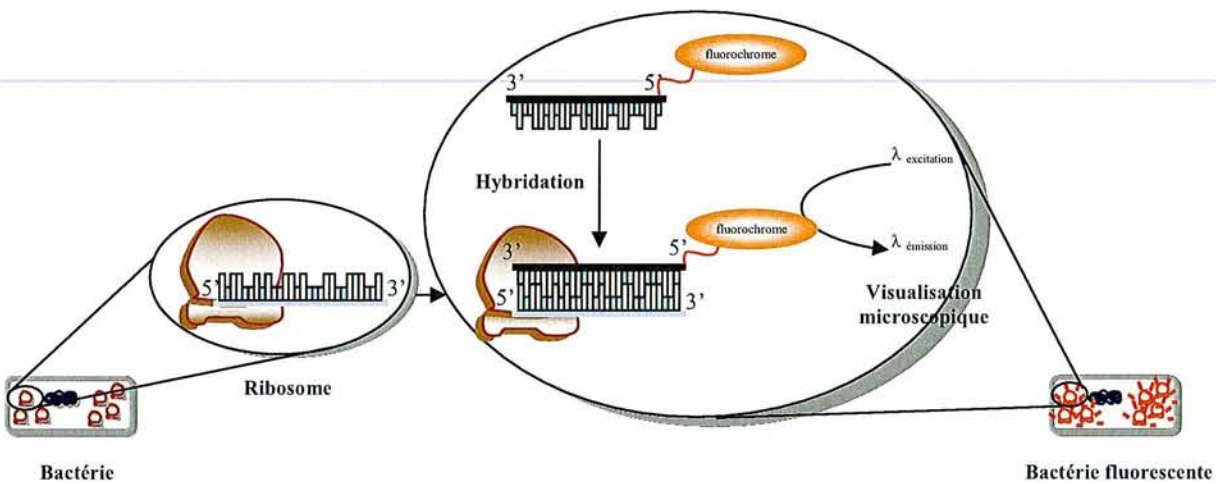


Figure 1. 6 : Principe de la technique d'hybridation in situ (FISH) sur une cellule entière.

La stabilité génétique et la relative abondance des ARNr 16S chez les bactéries en font une cible particulièrement intéressante pour détecter des groupes phylogénétiques spécifiques et obtenir un signal suffisamment puissant pour être observé au microscope en épifluorescence. La structure primaire des ARNr 16S est en effet caractérisée par des régions plus ou moins conservées présentant de ce fait des séquences uniques et spécifiques de tel ou tel groupe phylogénétique bactérien [Woese, 1987]. Par ailleurs, les bactéries contiennent une grande quantité de ribosomes (entre 10^3 et 10^5 par cellule) [Amann *et al.*, 1995] qui sont autant de sites de fixation pour les sondes au cours de l'hybridation.

En pratique, la technique FISH se déroule en plusieurs étapes successives : choix des sondes, concentration de l'échantillon par filtration de l'eau sur membrane, fixation, perméabilisation de la

membrane cellulaire par déshydratation, hybridation de la sonde sur la séquence cible, lavage pour éliminer l'excédent de sonde et enfin l'examen microscopique, où *Legionella* peut être visualisée et dénombrée.

Il existe cinq sondes oligonucléotidiques utilisées pour détecter spécifiquement *Legionella* (Tableau 1.10) dont les spécificités varient de 71% pour la sonde LEG226 [Manz *et al.*, 1995] à 90% pour la sonde LEG705 [Buchbinder *et al.*, 2002 ; Manz *et al.*, 1995].

Tableau 1. 10 : Sondes oligonucléotidiques utilisées pour la détection de Legionella par hybridation.

Sonde	Séquence de la sonde (5'-3')	Cible de la sonde	Références
LEG705	CTG GTG TTC CTT CCG ATC	***Legionella spp.***	Amann *et al.*, 1995 ; Manz *et al.*, 1995 ; Buchbinder *et al.*, 2002 ; Desai *et al.*, 1999
LEG226	TCG GAC GCA GGC TAA TCT	***Legionella spp.***	Manz *et al.*, 1995
LEG225	AAA TTA CCT CTC CAT	***Legionella spp.***	Satoh *et al.*, 2002
LEGPNE1	ATC TGA CCG TCC CAG GTT	***L. pneumophila***	Buchbinder *et al.*, 2002 ; Grimm *et al.*, 1998 ; Hayden *et al.*, 2001
P2	AGC TTT CAT CCA AAG ATA	***L. pneumophila***	Hayden *et al.*, 2001

Le principal atout de la technique FISH est sa détection spécifique de *Legionella* directement à partir des échantillons environnementaux en moins de 24 heures.

Par ailleurs, la séquence de la sonde doit présenter une spécificité suffisante pour éviter un trop grand nombre de mésappariements et doit de plus tenir compte de l'environnement (structure secondaire, présence/absence de protéines, ...) de la séquence ciblée définissant par son accessibilité. La structure secondaire complexe des ARNr, implique la formation de boucle et de tiges et la présence de protéines, qui sont autant de facteurs qui définissent une relative accessibilité d'une séquence ciblée [Fuchs *et al.*, 1998 ; Amann *et al.*, 1995].

Cependant, elle présente une limite lorsqu'elle est appliquée à des bactéries blessées, carencées ou à croissance lente. En effet, l'intensité de fluorescence dépend de la quantité de cibles dans la cellule, c'est-à-dire du nombre de copies d'ARNr. Or, le nombre de ribosomes par bactérie est directement corrélé avec le taux de croissance cellulaire [DeLong *et al.*, 1989 ; Amann *et al.*, 1995]. Ainsi, il est possible d'être sous le seuil de détection de la méthode pour certaines bactéries ne contenant pas assez de ribosomes [Lebaron *et al.*, 2001 ; Amann *et al.*, 1995]

Elle ne permet pas non plus de déterminer si la bactérie est viable. En effet, même si l'ARNr, cible de la technique FISH, est corrélé avec le taux de croissance des bactéries [DeLong *et al.*, 1989 ; Amann *et al.*, 1995], il ne reflète pas la viabilité de la bactérie puisque les molécules d'ARNr peuvent rester stables plusieurs heures après la mort de la cellule [McKillip *et al.*, 1998]. Par contre, l'hybridation *in situ* a été proposée par différents auteurs [Manz *et al.*, 1995 ; Joux et Lebaron, 2000] pour estimer une activité physiologique de la cellule bactérienne.

3.1.2.2.5 Cytométrie

La cytométrie en flux détecte (et peut permettre de trier si elle est accompagnée d'un trieur) des cellules bactériennes mises en suspension dans un liquide après marquage soit des acides nucléiques soit des constituants membranaires de ces bactéries [Phe *et al.*, 2005]. Elle permet donc l'analyse des constituants cellulaires bactériens grâce à l'appareil de détection, le cytomètre en flux. Une étape préliminaire d'hybridation de l'échantillon liquide avec un fluorochrome est nécessaire. Elle repose sur l'appariement d'une sonde nucléique complémentaire d'une séquence d'acide nucléique cible (d'ADN ou d'ARN) au sein de la cellule bactérienne. La sonde, spécifique à *Legionella*, est marquée par un fluorochrome (SYBR Green II, FITC) qui permet la détection de la cible au cytomètre en flux. En effet, les cellules marquées émettent des signaux lumineux après qu'elles aient été excitées, à la longueur d'onde spécifique de la molécule fluorescente incorporée. Ces signaux lumineux sont captés par des lasers et réfléchis à un système de filtres, qui sont convertis en impulsions électriques puis en signaux digitaux par des photomultiplicateurs.

La cytométrie en flux est une technique rapide qui a déjà montré ses preuves sur des échantillons d'eau contaminés en *Legionella* [Tyndall *et al.*, 1985]. Elle représente une méthode alternative intéressante pour le dénombrement des cellules bactériennes de l'air [Henningson *et al.*, 1998]. Elle peut caractériser les cellules d'un point de vue morphologique ou par l'intermédiaire d'un marquage, permettre la distinction entre cellules viables et non viables. Une seule étude à notre connaissance portant sur l'aérobiocontamination d'origine autre que *Legionella* utilise cette technique [Lange *et al.*, 1997].

Récemment, une nouvelle technique a été développée afin d'améliorer la technique de détection de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires, la cytométrie en phase solide, permettant d'analyser et compter les cellules fixées sur un support solide (membrane) grâce à un système automatique d'analyse d'images par balayage laser utilisant le système Chem*Scan* [Aurell *et al.*, 2004].

3.2 NIVEAUX DE CONTAMINATION EN *LEGIONELLA*

Legionella est considérée comme ubiquitaire de l'environnement hydrique. Avec le nombre croissant d'épidémies à *Legionella*, la bactérie est de plus en plus recherchée et ce, avec des outils de détection multiples.

3.2.1 Dans le milieu hydrique

3.2.1.1 Eaux dans l'environnement naturel

Les ressources en eau constituent le réservoir de *Legionella* (Tableau 1.11) : eaux souterraines, lacs, rivières, mer et océans.

Tableau 1. 11 : Concentrations de Legionella retrouvées dans les ressources naturelles en eau.

Site	Technique d'analyse	Concentration dans l'eau (L^{-1})	Références
43 lacs	Immunofluorescence directe	$9,1.10^3$ à $3,3.10^7$ *L. pneumophila*	Fliermans *et al.*, 1981
6 rives	Immunofluorescence directe	$9,1.10^3$ à $7,6.10^5$ *L. pneumophila*	
33 eaux souterraines	culture	$3,0.10^2$ à $2,4.10^4$ *Legionella spp.*	Costa *et al.*, 2005
5 eaux d'océan	Immunofluorescence directe	$2,8.10^4$ *L. pneumophila* (moyenne sur 28 % échantillons)	Palmer *et al.*, 1993
4 eaux d'océan	culture	Non détectées	
5 eaux d'océan	PCR	Positif < 1.10^3 *L. pneumophila* (moyenne sur 20% échantillons)	
26 eaux de mer	Immunofluorescence directe	$8,7.10^6$ à $5,6.10^7$ *Legionella spp.*	Ortiz-Roque et Hazen, 1987

Costa *et al.* [2005] rapportent les résultats de sept années de surveillance sur six sites d'eaux souterraines entre 1997 et 2003 où *Legionella* a été retrouvée dans les tous les prélèvements réalisés entre $3,0.10^2$ et $2,4.10^4$ UFC-*Legionella spp.*L^{-1}.

Fliermans *et al.* [1981] fait de même en explorant les lacs et rivières de la zone Est des Etats-Unis. Les 793 échantillons prélevés, analysés par immunofluorescence directe, contenaient *L. pneumophila* SGs. 1 à 4 à des concentrations élevées : de $9,1.10^3$ à $3,3.10^7$ *L. pneumophila*.L^{-1} eau de lacs et de $9,1.10^3$ à $7,6.10^5$ *L. pneumophila*.L^{-1} eau des rives.

L'eau de mer de cinq sites de bord de plage a aussi été analysée par immunofluorescence directe, dans une zone touristique fortement fréquentée de l'île de Porto Rico [Ortiz-Roque et Hazen, 1987]. Il s'est avéré que tous les sites étaient contaminés par *L. pneumophila*, de $2,1.10^6$ à $3,1.10^7$ cellules.L^{-1} mais aussi par d'autres espèces de *Legionella* (*L. bozemanii, L. dumoffii, L. micdadei, L. gormanii, L. longbeachae*) dont les concentrations se situaient entre $8,2.10^4$ et $4,9.10^6$ selon les espèces et les sites. Il est à noter que pour un seul site analysé, l'espèce *L. dumoffii* n'a pas été détectée par immunofluorescence directe.

Palmer *et al.* [1993] se sont aussi intéressés à l'occurrence de *Legionella* dans l'eau de mer. Ils ont pour cela réalisé des prélèvements dans 5 échantillons d'eau de mer qu'ils ont analysés par la méthode de culture et par des méthodes de biologie moléculaire. Les résultats rapportés par ces auteurs montrent que tous les échantillons d'eau de mer analysés par la culture sont négatifs en *Legionella* alors que la technique de PCR permet d'en détecter dans 20% des échantillons. Dans cette étude, *Legionella* est présente en plus faible quantité, par rapport aux travaux de Ortiz-Roque et Hazen [1987] du fait vraisemblablement de la provenance des échantillons d'eau ; les premiers [Palmer *et al.*, 1993] étant prélevés en pleine mer donc soumis à une salinité importante; alors que les seconds [Ortiz-Roque et

Hazen, 1987] ont été prélevés en bord de plage dans une zone de mélange avec un apport d'eau douce pouvant expliquer une meilleure survie.

L'eau embouteillée de quinze pays (européens et non européens), représentant 64 types d'eau, a été analysée afin de détecter *Legionella*. Dans six bouteilles, provenant de quatre pays, *Legionella* a été détectée par PCR alors qu'aucune n'a été retrouvée en culture [Klont *et al.*, 2006].

3.2.1.2 Eaux dans les environnements artificiels

La bactérie *Legionella* est détectée dans diverses installations hydriques artificielles : réseaux d'eau chaude, tours aéroréfrigérantes et unités dentaires.

De très nombreuses études portent sur la prévalence des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire ; quelques exemples sont illustrés ci-après.
La prévalence de *Legionella* dans les réseaux collectifs de distribution d'eau chaude a été évaluée à 37% dans une étude australienne [Hedges et Roser, 1991]. En région parisienne, une enquête révélait que près de 70% des équipements collectifs de distribution d'eau chaude contiennent *Legionella* avec des concentrations allant jusque 1.10^6 UFC.L^{-1} [CSHPF, 2001].
En Italie, *Legionella* est répartie au sein de l'ensemble du réseau de distribution d'eau chaude d'une ville et est détectée à hauteur de 40% et de 33% pour *L. pneumophila*. Les concentrations moyennes de *Legionella* varient de <200 à $2,4.10^3$ *Legionella* cultivables.L^{-1} dans plusieurs immeubles communautaires (respectivement hôtels-appartements privés et hôpitaux) [Leoni *et al.*, 2005]. La contamination par *Legionella* des réseaux d'eau chaude des hôtels italiens est confirmée par une étude, récente où 75% des immeubles présentaient des concentrations supérieurs à 1.10^3 *Legionella* cultivables.L^{-1} [Borella *et al.*, 2005].

De même, la prévalence des légionelles dans les tours aéroréfrigérantes est aussi largement documentée. Ces installations sont propices au développement de *Legionella* et de nombreuses études illustrent sa présence en forte concentration atteignant 10^6 UFC.L^{-1} [Cordes *et al.*, 1980]. Une étude réalisée entre 1995 et 1999, sur 70 installations parisiennes, a mis en évidence que 75% de ces structures présentaient des concentrations supérieures ou égales à 100 UFC.L^{-1} et 25% étaient supérieures à $1,0.\ 10^5$ UFC.L^{-1} [CSHPF, 2001].

Des échantillons d'eau provenant de 99 unités dentaires ont montré une contamination dans 33% des cas par *Legionella* avec un nombre d'échantillons contaminés plus important l'après-midi que le matin [Singh et Coogan, 2005]. Dans une autre étude portant sur 28 unités dentaires américaines, *Legionella* a été détectée dans 68% des échantillons et *L. pneumophila* dans 8%, avec une concentration atteignant 1.10^6 *Legionella*.L^{-1} et 1.10^7 *Legionella*.L^{-1} pour respectivement 36 et 19% des échantillons [Atlas *et al.*, 1995].

3.2.2 Dans le milieu aérien

Malgré la relation entre source génératrice d'aérosols et légionellose, rares sont les recherches de *Legionella* entreprises directement sur le milieu aérien. Seules existent quelques études microbiologiques dont les informations fournies sur la présence de *Legionella* dans l'air sont regroupées dans le tableau 1.12.

Au niveau environnemental, deux principes de collecte d'aérosols ont été utilisés afin de détecter *Legionella* dans l'air : l'impaction sur milieu solide et l'impaction sur milieu liquide.

Tableau 1. 12 : Concentrations en légionelles mesurées dans l'air par différentes techniques d'analyses.

			Concentration dans l'air		
Site	**Principe de collecte**	**Volume d'air échantillonné (L)**	***Legionella*-UFC.m^{-3}**	***Legionella*-FISH.m^{-3}**	**Références**
Tour	Impaction liquide	240	2,3.10^{3}		Breiman *et al.*, 1990b
	Impaction solide	810	[1]		
Tour	Impaction solide	849	0		Ishimatsu *et al.*, 2001
	Impaction liquide	600	90		
Tour	Impaction liquide	40 000	0	3,30.10^{3}	Mathieu *et al.*, 2006
Tour	Impaction liquide	40 000	0	5,50.10^{3}	
Tour	Impaction liquide	40 000	0	5,60.10^{3}	
Tour	Impaction liquide	40 000	0	5,90.10^{3}	
Bassin[2]	Impaction liquide	40 000	5,4.10^{3}	4,91.10^{3}	
Bassin[2]	Impaction liquide	40 000	3,3.10^{2}	0	
Douche	Impaction solide	ND	190		Breiman *et al.*, 1990a
Douche	Impaction solide	ND	60		
Douche	Impaction liquide	7 500	0,27		Dennis *et al.*, 1984
Douche	Impaction liquide	7 500	0,4		
Douche	Impaction solide	850	6		Bollin *et al.*, 1985
Douche	Impaction solide	850	3,5		

[1] Boîtes de Pétri recouvertes de flores autres que *Legionella* (moisissures et bactéries) ; [2] Bassin d'aération de boue activée ; ND = Non défini par les auteurs.

La plage des concentrations en *Legionella* rapportées dans le tableau 1.12 s'étend de 0,27 à 5,4.10^{3} UFC.m^{-3} air. Une nouvelle méthode de détection de Légionelles dans l'air est utilisée depuis peu, l'hybridation *in situ* (FISH), une seule étude en fait mention avec succès récemment [Mathieu *et al.*, 2006]. Elle permet de détecter *Legionella* alors que même la culture ne le permet pas. Pascual *et al.* [2001] ont aussi obtenu des résultats positifs de détection de Légionelles dans l'air par biologie moléculaire (PCR) alors que la culture ne le permettait pas, sans préciser les concentrations.

Deux études [Breiman *et al.*, 1990b ; Ishimatsu *et al.*, 2001] ont permis de comparer la performance de collecte des deux principes de collecte de *Legionella* aéroportée et ont conclut à la supériorité de l'impaction liquide sur l'impaction sur milieu solide.

3.3 SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE ET GESTION DU RISQUE *LEGIONELLA*

En France, la surveillance environnementale et la gestion du risque de contamination par les légionelles s'effectuent sur l'eau des installations à risque par la méthode conventionnelle de culture sur gélose. Diverses circulaires ont été publiées afin de définir cette surveillance environnementale et les mesures préventives et curatives à mettre en place en cas de contamination :

- La circulaire DGS n°97/311 du 24 avril 1997 précise l'entretien et la maintenance des installations à risque dans les établissements de santé et les établissements recevant du public et précise qu'en dessous d'une concentration de 10^3 UFC-*L. pneumophila*.L^{-1} eau, le risque d'apparition de légionellose est très faible, même si aucune donnée de la littérature ne peut le confirmer.
- La circulaire DGS n°98/771 du 31 décembre 1998 complète la précédente circulaire. Elle préconise en effet la mise en place d'une surveillance de la contamination des réseaux des établissements de santé, des établissements recevant du public ainsi que des installations à risque, comme les trous aéroréfrigérantes.
- La circulaire DGS/DHOS n°2002/243 du 22 avril 2002 insiste sur les mesures de prévention et les modalités de surveillance à mettre en œuvre pour lutter contre la légionellose dans les établissements de santé : surveillance de la concentration en légionelles (points de contrôle et fréquence) et de la température. Elle fixe également un objectif cible, qui est le maintien à une concentration inférieure à 10^3 *L. pneumophila*.L^{-1} (Tableau 1.13).

Tableau 1. 13 : Mesures de gestion en cas de contamination par L. pneumophila d'un réseau d'eau chaude d'un établissement de santé [CSHPF, 2005].

Responsable des investigations	Concentrations limites	Mesures de gestion	Communication
CLIN avec appui du C.CLIN si nécessaire	$1,0.10^3$ UFC.L^{-1} en *L. pneumophila*	• Eviter la stagnation et assurer une bonne circulation de l'eau • Lutter contre l'entartrage et la corrosion, par une conception et un entretien adapté à la qualité de l'eau et aux caractéristiques de l'installation • Maintenir l'eau à une température élevée dans les installations (production et distribution) et mitiger l'eau au plus près des points d'usage	Lorsqu'elle est nécessaire, la communication vers les patients est de la responsabilité du directeur de l'établissement.

CLIN : Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales ; C.CLIN : Centre de Coordination de la Lutte des Infections Nosocomiales.

- Récemment, la circulaire du 28 octobre 2005 (DGS n°2005/243) renforce l'établissement de contrôle dans les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées.

En cas de dépassement de la concentration limite de 10^3 UFC.L^{-1} en *L. pneumophila*, la désinfection se fait classiquement par « choc chloré » (15 mg de chlore pendant 24 heures ou 30 à 50 mg de chlore libre pendant 2 à 3 heures, suivi d'une vidange) ou par « choc thermique » (la température des ballons d'eau chaude doit atteindre 65 à 70°C en fonction de l'étendue du réseau) [Jarraud *et al.*, 2000].

Les installations de type tours aéroréfrigérantes sont aussi soumises à une surveillance environnementale accrue :

- La circulaire DGS/DHOS n°2002/243 du 22 avril 2002 précise que l'objectif cible est de maintenir la concentration en *Legionella* à un niveau inférieur à 10^3 *Legionella*.L^{-1} dans l'eau des tours aéroréfrigérantes (Tableau 1.14).
- La circulaire DGS/DHOS n°2003/306 du 26 juin 2003 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les tours aéroréfrigérantes des établissements de santé qui préconise une surveillance au moins une fois au cours des mois d'été et au moins deux fois de juin-septembre.

Tableau 1. 14 : Mesures de gestion en cas de contamination par Legionella de l'eau d'une tour aéroréfrigérante [DGS, 2002].

Concentrations limites	Mesures de gestion
$1{,}0.10^3$ UFC.L^{-1} en *Legionella sp.*	Mise en œuvre des mesures nécessaires pour atteindre une concentration ≤ $1{,}0.10^3$ UFC.L^{-1} de *Legionella sp.*
$1{,}0.10^5$ UFC.L^{-1} en *Legionella sp.*	• Arrêt du fonctionnement du système de refroidissement • Information de la DDASS ou du service d'inspection des Installations Classées dans le cas où la tour relève de la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement • Vidange, nettoyage, désinfection avant remise en service

Pour les établissements thermaux, l'arrêté du 19 juin 2000 et sa circulaire prévoient la surveillance de la contamination en *Legionella* à l'émergence et aux points d'usage et précisent que les analyses doivent montrer l'absence de détection quel que soit le point de prélèvement.

Aucune norme n'a encore été établie concernant des valeurs limites dans les aérosols du fait de la complexité de la mesure et de la détection des légionelles dans les aérosols.

4 SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DU RISQUE *LEGIONELLA*

4.1 LES SYSTEMES DE SURVEILLANCE DU RISQUE *LEGIONELLA*

Les objectifs du système de surveillance de *Legionella* sont de plusieurs ordres [Campèse et Decludt, 2000] :

- Au niveau local, la déclaration permet à la DDASS de réaliser une enquête afin d'identifier les expositions à risque, de rechercher d'autres cas liés à ces expositions et de prendre les mesures de contrôle appropriées.

- Au niveau national, elle a pour objectif de connaître la fréquence, les tendances et les principales caractéristiques épidémiologiques et d'identifier des cas groupés.
- Au niveau européen, l'objectif principal est d'identifier des cas groupés pouvant être rattachés à une source commune d'exposition lors d'un voyage, afin de prendre les mesures de prévention nécessaires.

4.1.1 Surveillance du risque *Legionella* en France

En France, la surveillance épidémiologique de la légionellose repose sur plusieurs systèmes complémentaires définis dans un guide d'investigation et d'aide à la gestion depuis juillet 2005 [CSHPF, 2005].

4.1.1.1 Déclaration obligatoire : signalement et notification

Depuis 1987, la surveillance de la malade du légionnaire est basée sur le système de la Déclaration Obligatoire (DO) et coordonnée par l'Institut de Veille sanitaire (InVS). Depuis 2003, afin de mieux protéger l'anonymat des patients et de rendre plus opérationnel le système de déclaration, la DO de légionellose s'effectue en deux temps :

- Une fois le diagnostic posé, le signalement systématique du cas par les cliniciens ou les biologistes est transmis à la DDASS et à l'InVS (article R3113-4 du code de la santé publique) ;
- Une fiche anonymisée est envoyée, lorsque tous les renseignements sont complétés. De nouveaux items (date d'hospitalisation et exposition à risque) ont été rapportés sur cette nouvelle fiche. Par ailleurs, dès le signalement, la DDASS effectue systématiquement un recueil d'informations relatives aux caractéristiques du patient et à ses activités à l'aide d'un questionnaire standardisé (article R3113-1 à 3 du code de la santé publique).

4.1.1.2 Signalement des infections nosocomiales

Le décret du 26 juillet 2001 [J.O., 2001] impose aux établissements de santé de signaler certains cas d'infections nosocomiales « rares ou particulières » simultanément au C.CLIN et à la DDASS à l'aide d'une fiche standardisée notamment lors d'infections suspectées d'être causées par un germe présent dans l'eau ou dans l'air environnant et à l'origine des maladies à DO (Figure 1.7).
Le C.CLIN sur la base des informations reçues, peut assister l'établissement de santé dans l'investigation des cas et l'élaboration de recommandations à sa demande ou à celle de la DDASS.
La DDASS :

- Vérifie l'application des mesures de contrôle et coordonne les investigations menées ;
- Vérifie que chaque signalement d'infection nosocomiale a donné lieu à l'envoi d'une fiche de notification obligatoire par l'établissement ;

- Transmet les fiches validées à l'InVS qui peut apporter un soutien à l'investigation.

[CSHPF, 2005]

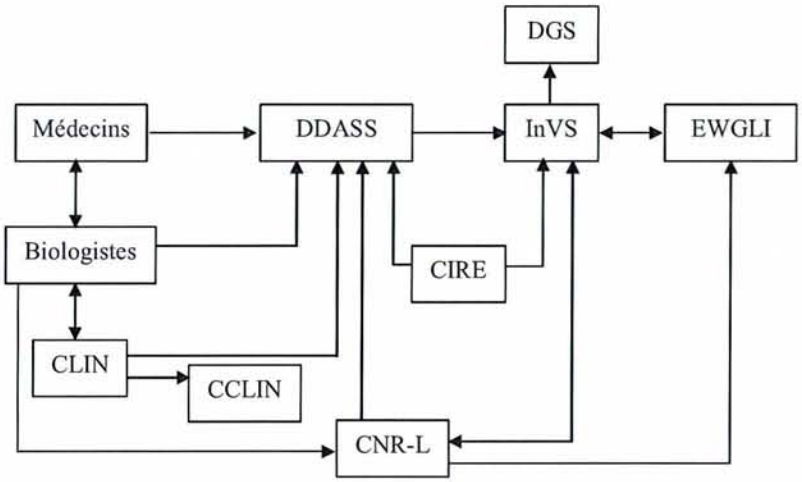


Figure 1. 7 : Organisation de la surveillance et de la collecte des données des cas de légionelloses en France [CSHPF, 2005].

4.1.1.3 Surveillance bactériologique par le Centre National de Référence des *Legionella* (CNR)

Chaque souche de *Legionella* d'origine clinique isolée en France doit être envoyée au CNR des *Legionella.*

Ce centre a pour rôle :

- Notifier à l'InVS chaque cas de légionellose pour lequel une souche a été isolée et/ou reçue au CNR afin de compléter les informations et les transmettre aux DDASS ;
- Alerter l'InVS en signalant l'identification de souches présentant le même profil génétique ;
- Apporter aux DDASS et à l'InVS ses compétences microbiologiques lors des enquêtes épidémiologiques qu'il s'agisse d'épisodes épidémiques ou d'enquêtes ponctuelles pour confirmer la nature groupée (même souche) de cas liés épidémiologiquement ;
- Assurer l'identification précise et le typage moléculaire des souches d'origine clinique ou environnementale ;
- Mettre en place une collection bactérienne et une sérothèque nationale ayant pour but d'identifier l'extension de la transmission bactérienne et l'origine des cas groupés, grâce au typage moléculaire systématique par électrophorèse par champ pulsé de toutes les souches de légionelles : cette banque de données est informatisée et contient tous les profils de macrorestriction identifiés depuis 1998, elle contient actuellement plus de 5000 souches dont 1300 souches d'origine clinique ;
- Participer au réseau européen EWGLI : échange et comparaison de souches, travaux de recherche.

Par ailleurs, le CNR reçoit de sérums, des urines et des produits pathologiques accompagnés d'informations sur les cas pour confirmation de diagnostic ou diagnostic de première intention.
L'amélioration de la surveillance en France a permis de faire progresser les connaissances sur *Legionella* mais de nombreuses questions demeurent. A ce titre, un « plan d'action et de prévention des légionelloses » a été mis en place par le ministère afin de progresser dans les connaissances aussi bien du point de vue clinique, microbiologique qu'environnemental [PNSE, 2004].

4.1.2 Surveillance du risque *Legionella* en Europe

Depuis 1997, la France participe de façon plus active à un réseau européen de la surveillance des légionelloses acquises lors des voyages. Ce réseau (EWGLI : European Working Group for *Legionella* Infection), créé en 1987, qui regroupe actuellement 36 pays signale aux autorités sanitaires du pays concerné, tout cas de légionellose survenu chez une personne ayant voyagé pendant la période d'incubation en précisant les dates et lieux de séjour afin d'identifier des cas groupés (Figure 1.8). Les pays européens suivent les procédures décrites dans le guide européen de contrôle et prévention des cas de légionellose associés au voyage qui a été approuvé par la commission européenne [Lee et Joseph, 2002].

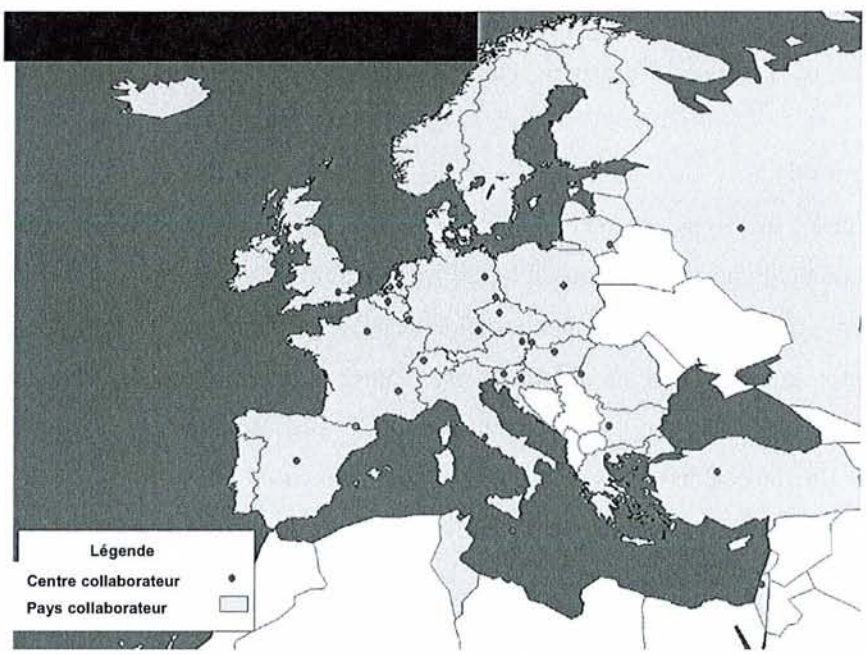


Figure 1. 8 : Pays et centres de collaboration EWGLI en 2004

Lorsqu'il s'agit de cas isolés, EWGLI informe et conseille l'établissement en cause. S'il s'agit de cas groupés, une enquête épidémiologique est ouverte. Face à des cas groupés et en l'absence de certification dans un délai de six semaines par les autorités sanitaires que les mesures ont été prises, le nom de l'établissement en cause est inscrit sur le site Internet de EWGLI (www.ewgli.org).

Ce réseau est coordonné par le Centre anglais de surveillance des maladies transmissibles (CDSC : « Communicable Disease Surveillance Center ») [CSHPF, 2005 ; Jarraud *et al.*, 2000].

4.1.3 Surveillance du risque *Legionella* dans le monde

Il n'existe pas actuellement de réseau informatique recensant tous les cas de légionelloses dans le monde.

Toutefois, des efforts sont entrepris aux États-Unis qui dispose de deux systèmes nationaux de surveillance et d'un système informatisé des données. C'est d'ailleurs le premier pays qui a disposé en 1976, de données nationales de surveillance de la maladie du Légionnaire par le CDC (Center for Disease Control). Mais, Marston *et al.* [1994] ont estimé que la maladie du Légionnaire était sous-déclarée au CDC, sûrement du fait du système de déclaration mis en place : seuls les médecins notifient les cas de légionelloses aux Etats-Unis [Infuso *et al.*, 1998].

De plus, aucun des systèmes de surveillance américains n'est capable de détecter les légionelloses dues aux voyages dans ce pays. Depuis les menaces de bioterrorisme et l'augmentation des épidémies de légionelloses, le CDC a envisagé de mettre rapidement en place une surveillance électronique nationale implantée au niveau d'une plateforme logistique permettant de déterminer les légionelloses dues aux voyages [Fields *et al.*, 2002 ; Jernigan, 2001].

4.2 Epidemiologie des Legionelloses Dans le Monde

La mise en place des réseaux de surveillance du risque *Legionella* a permis de disposer de bases de données épidémiologiques des cas de légionelloses dans le monde.

4.2.1 Formes épidémiologiques

Les légionelloses observées dans tous les pays où elles sont recherchées apparaissent sous trois formes épidémiologiques [Bornstein et Fleurette, 1992 ; Cordes et Fraser, 1980] (Figure 1.9).

- Type épidémique

La maladie apparaît de façon brutale chez un grand nombre d'individus [Cordes et Fraser, 1980]. C'est le cas à la fois de la première épidémie de légionellose de Philadelphie de 1976 où 29 personnes décédèrent sur 182 atteintes [Tsai *et al.*, 1979 ; Fraser *et al.*, 1977] mais aussi de la première épidémie de fièvre du Pontiac à Pontiac en 1968 où 144 personnes furent atteintes de la maladie [Glick *et al.*, 1978].

- Type endémique

La forme endémique s'étend dans le temps [Cordes et Fraser, 1980], elle résulte soit de retards au diagnostic, soit de difficultés d'éradication de la source infectieuse.

- Type sporadique

La maladie atteint quelques individus isolés au sein d'une population [Cordes et Fraser, 1980] ; c'est la forme la plus fréquente [Che *et al.*, 2003 ; Visca *et al.*, 1999 ; Stout *et al.*, 1992 ; Helms *et al.*, 1984].

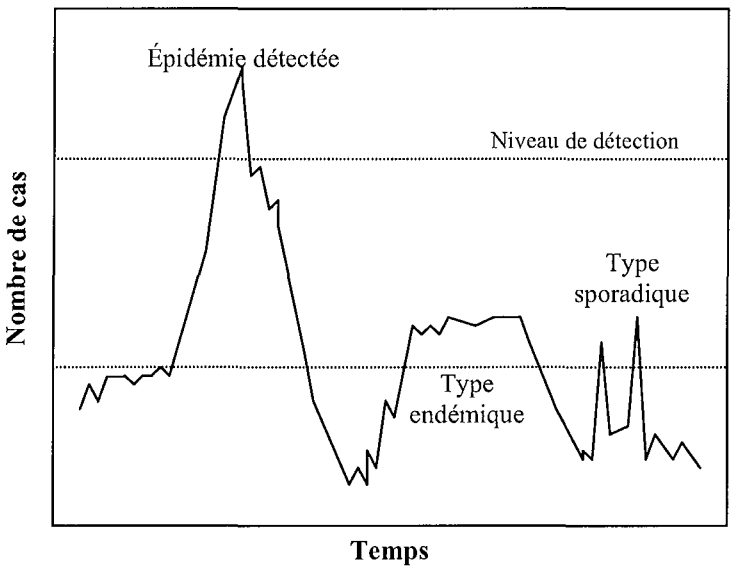


Figure 1. 9 : Illustration des différents types épidémiologiques [Haas *et al.*, 1999].

4.2.2 Epidémies de fièvre de Pontiac

La fièvre de Pontiac n'étant pas soumise à la déclaration obligatoire et sa symptomatologie non spécifique, cette pathologie due à *Legionella* passe souvent inaperçue et les renseignements concernant son occurrence sont rares et sans doute sous estimés. Aucun système informatisé, ni d'autorités sanitaires ne la recense. Seuls les travaux de recherche publiés dans la littérature donnent une représentation très partielle des épidémies.

Les épidémies de fièvre de Pontiac ont été essentiellement recensées en Amérique du Nord et surtout aux Etats-Unis pour la plus grande majorité. Quelques épidémies ont été recensées en Europe mais encore aucune en France.

4.2.2.1 Epidémies de fièvre de Pontiac en Amérique du Nord

La première épidémie de fièvre de Pontiac a eu lieu à Pontiac (Etats-Unis) en 1968 affectant 95 employés et 49 visiteurs du fait d'un système de climatisation de l'immeuble contaminé [Glick *et al.*, 1978]. Depuis presque 40 ans, moins de vingt épidémies ont été décrites mais elles apparaissent tout de même de manière récurrente. Le Tableau 1.15 relate les épidémies de fièvre de Pontiac déclarées depuis 1968 en Amérique du Nord. Ce sont des adultes jeunes et des enfants qui ont été atteints préférentiellement.

Tableau 1. 15 : Epidémies de fièvre de Pontiac en Amérique du Nord.

Année	Pays	Nombre de cas	Age moyen (ans)	Taux d'attaque (%)	Source d'exposition	Espèce *Legionella*	Références
2002	Etats-Unis	117	37	60	Fontaine décorative	*L. anisa*	Jones *et al.*, 2003
2002	Etats-Unis	47	20	63	Piscines	*L. dumoffii, L. maceachernii, L. micadadei*	Huhn *et al.*, 2005
2000	Etats-Unis	15	30	[1]	Lavage à haute pression	*L. pneumophila*	Castor *et al.*, 2005
1999	Etats-Unis	22	12	11	Piscines	*L. pneumophila* SG 6	Benin *et al.*, 2002
1998	Etats-Unis Etats-Unis	49 68	ND ND	71 66	Piscines thermales Piscines	*L. micadadei*	Fields *et al.*, 2001
1992	Etats-Unis	13	ND	38	Réseau d'eau chaude	*L. pneumophila*	Miller *et al.*, 1993
1991	Etats-Unis	6	ND	[1]	Réseau d'eau chaude	NR	Thomas *et al.*, 1993
1988	Etats-Unis	34	de 36 à 46	94 71	Fontaine décorative	*L. anisa*	Fenstersheib *et al.*, 1990
1984	Etats-Unis	86	29	78	Tour aéroréfrigérante de climatisation	*L. pneumophila*	Friedman *et al.*, 1987
1982	Etats-Unis	14	32	[1]	Piscine		Mangione *et al.*, 1985
1981	Canada	317	ND	45	Liquide de refroidissement, usine d'assemblage automobile	*L. feelei*	Herwaldt *et al.*, 1984
1981	Etats-Unis	34	27,9	[1]	Piscine	*L. pneumophila*	Spitalny *et al.*, 1984
1973	Etats-Unis	10	18-39	[1]	Compresseur à air	*L. pneumophila*	Fraser *et al.*, 1979
1968	Etats-Unis	144	ND	53	Système de climatisation	NR	Glick *et al.*, 1978

ND = Non Défini par les auteurs ; NR = Non Détectée dans les échantillons analysés ; [1] Taux d'attaque non calculé car le nombre de personnes exposées est non disponible

Le taux d'attaque (rapport du nombre de malades et du nombre de personnes exposées dans un contexte épidémique) de la fièvre de Pontiac est relativement élevé et éminemment variable, variant de 11 à 94%. Le taux d'attaque de l'épidémie de 1999 aux Etats-Unis de 11% est le plus faible des épidémies étudiées. Toutefois, il faut noter qu'elle était concomitante avec une épidémie de maladie du Légionnaire [Benin *et al.*, 2002] ce qui peut expliquer ce faible taux. Les sources d'exposition sont identiques à celles mises en cause pour l'autre forme de légionellose (la maladie du Légionnaire), ce sont toutes des sources potentiellement créatrices d'aérosols. L'espèce *L. pneumophila* n'est pas la plus souvent retrouvée responsable des épidémies de fièvre de Pontiac au contraire de la maladie du Légionnaire.

4.2.2.2 Epidémies de fièvre de Pontiac en Europe

Les épidémies de fièvre de Pontiac sont encore moins déclarées et/ou moins nombreuses sur le continent européen qu'américain.

En effet, le Tableau 1.16 relate quatre épidémies dont deux où *Legionella* n'a pas été détectée dans les échantillons environnementaux, mais la source d'exposition était bien déterminée. De plus, les symptômes des personnes atteintes faisait fortement suspecter une épidémie de fièvre de Pontiac [Götz *et al.*, 2001 ; Lüttichau *et al.*, 1998].

Tableau 1. 16 : Epidémies de fièvre de Pontiac en Europe.

Année	Pays	Nombre de cas	Age moyen (ans)	Taux d'attaque (%)	Source d'exposition	Espèce *Legionella*	Références
1999	Suède	29	41	71	Fontaine décorative	NR	Götz *et al.*, 2001
1997	Danemark	5	ND	ND	Boue dans bassin de décantation	*Legionella*	Gregersen *et al.*, 1999
1995	Danemark	13	ND	ND	Piscine	NR	Lüttichau *et al.*, 1998
1988	Royaume-Uni	170	enfants	ND	Piscine	*L. micdadei*	Goldberg *et al.*, 1992

ND = Non Défini par les auteurs ; NR = Non Détectée dans les échantillons analysés

4.2.3 Epidémies de la maladie du Légionnaire

4.2.3.1 Epidémies de la maladie du Légionnaire aux Etats-Unis

Depuis 1976, les Etats-Unis disposent de données nationales de surveillance de la maladie du Légionnaire par le CDC (Center for Disease Control) mais seules les données depuis 1984 sont disponibles [EPA, 1999].

Le nombre de cas annuels déclarés de maladie du Légionnaire entre 1984 et 1996 est de 750 à 1198 cas, ce qui représente une incidence de 3,5 à 4,7 cas par millions d'habitants [EPA, 1999] (Figure 1.10). De manière étonnante, aucune donnée postérieure à 1996 concernant la population américaine n'a fait l'objet de publication, suggérant un intérêt faible outre-atlantique sur cette problématique de santé publique ou un système de surveillance peu performant.

Une analyse des données du CDC entre 1980 et 1989 montra que *L. pneumophila* SG.1 était responsable de 71,5% des cas de maladie du Légionnaire [Marston *et al.*, 1994].

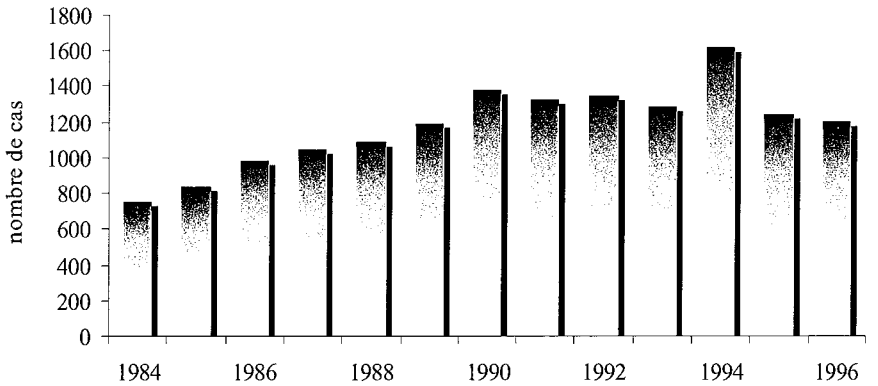


Figure 1. 10 : Evolution du nombre de cas de légionelloses déclarés aux Etats-Unis entre 1984 et 1996 [EPA, 1999].

Marston *et al.* [1994] cite deux études dans lesquelles les infections à *Legionella* représentaient 3,4 à 4,6% des cas de pneumonies. En projetant cette proportion au nombre total estimé de pneumonies aux Etats-Unis (500 000 cas), ils estiment entre 17 000 et 23 000 cas annuels de maladie du Légionnaire. Pourtant, moins de 2 000 cas de maladie du Légionnaire sont signalés au CDC (équivalent voire inférieur au nombre de cas déclarés pour l'Europe) ; par conséquent, ce système détecterait moins de 15% des cas de pneumonies dues à *Legionella* aux Etats-Unis. Marston *et al.* [1994] concluent donc que la maladie du Légionnaire est sous-déclarée au CDC, sûrement du fait du système de déclaration mis en place.

4.2.3.2 Epidémies de maladies du Légionnaire en Europe

Les pays membres du groupe de travail européen sur les infections à *Legionella* (EWGLI), fournissent des données annuelles en remplissant un ensemble de formulaires de notification standardisés seulement depuis 1993 grâce à un renforcement du dépistage. Les informations épidémiologiques et microbiologiques sur les légionelloses ne concernent pas seulement les infections dues aux voyages, mais toutes les sources de contamination possibles (communauté, nosocomiale, ...). Les données présentées par la figure 1.11 proviennent de 28 pays sur 31, participant pendant toute cette période à ce programme de surveillance EWGLI.

Depuis 1993, l'amélioration du dépistage des cas de maladie du Légionnaire, au niveau national, dans les pays membres de EWGLI a permis une augmentation fulgurante des cas notifiés [OMS, 2000]. En effet, de 1993 à 2002, le nombre de cas de maladies du Légionnaire déclarés ont augmenté presque d'un facteur quatre passant de 1242 à 4696 cas [Joseph, 2004].
Ainsi, le taux d'incidence (cas par millions d'habitants) de la maladie du Légionnaire est passé de 3,7 cas par millions d'habitants en 1993 à 10,1 cas par millions d'habitants en Europe en 2002 [Joseph, 2004]. Aujourd'hui, il reste constant puisqu'en 2004, l'incidence moyenne déclarée de la légionellose en Europe était de 1,0 cas pour 100 000 habitants [Campèse *et al.*, 2005].

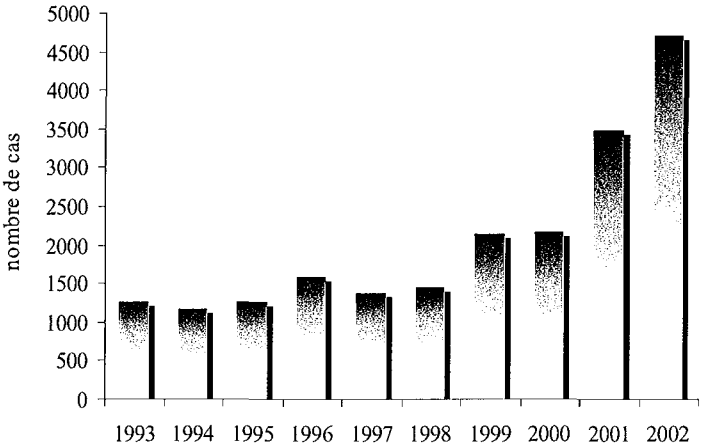


Figure 1. 11 : Evolution du nombre de cas de légionelloses déclarés en Europe entre 1993 et 1999 [Joseph, 2004 ; OMS, 2000].

Toutefois, les pays membres de EWGLI ne sont pas encore égaux en terme d'outils de dépistage nationaux. Ainsi, le pays à la plus forte déclaration est peut être le pays où la surveillance est la plus renforcée plutôt que le pays où l'incidence est réellement la plus élevée. Depuis 2000, les pays déclarant le plus de cas de maladies du Légionnaire sont l'Espagne (1380 cas en 2002) puis la France (1018 cas en 2002), largement devant les autres pays membre de EWGLI [Joseph, 2004] présentés auparavant dans la figure 1.11.

Bien entendu, les taux d'incidence de la maladie du Légionnaire sont variables suivant les pays pour les mêmes raisons évoquées ci-dessus. Ainsi en 2002, un taux inférieur à un cas par millions d'habitants était reporté pour la Pologne et la République slovaque tandis que l'Espagne restait toujours en tête avec 34,1 cas de légionelloses par millions d'habitants [Joseph, 2004].

Enfin, en 1999, le nombre de cas de légionelloses notifiés en Europe était de 2136 dont 193 décès (létalité de 9%) [OMS, 2000]. Le taux d'infection moyen en Europe, de 5,4 cas par million d'habitants, a été calculé sur la base de 398 millions d'habitants. L'espèce *L. pneumophila* représentait 95% des cas déclarées en 1999 avec 65% des cas dus à *L. pneumophila* SG1 [OMS, 2000].

4.2.3.3 Epidémies de maladies du Légionnaire en France

La surveillance des légionelloses en France a débuté en 1988 avec la déclaration obligatoire de cette maladie (Figure 1.12).

La sous-déclaration des cas était alors importante, puisque la sensibilité de ce moyen de surveillance a été évaluée à 13% par la méthode de capture-recapture, comparé à 58% pour la déclaration des laboratoires de référence (et 66% dans une enquête réalisée spécialement dans des laboratoires pour tester les interactions entre moyens de déclaration). Ainsi, le nombre de cas annuels estimés en France entre 1988 et 1990 (en corrigeant la sous-déclaration de cette maladie) est de 2000 à 3000 cas [Infuso *et al.*, 1998].

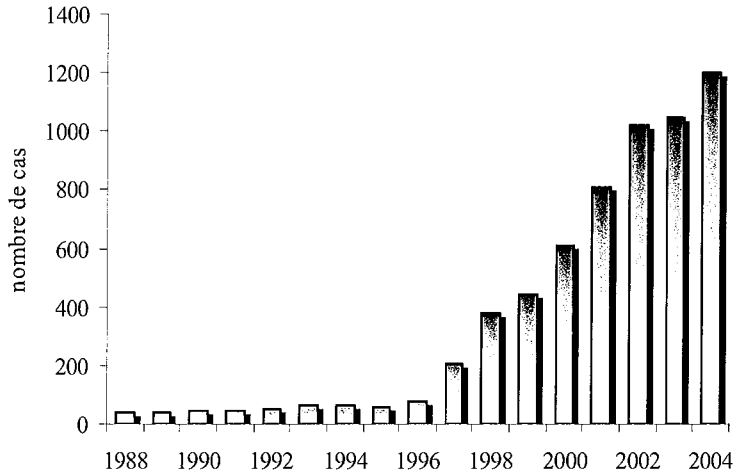


Figure 1. 12 : Evolution du nombre de cas de légionelloses déclarés en France depuis 1988 [Campèse *et al.*, 2005 ; Campèse *et al.*, 2004 ; Campèse *et al.*, 2003 ; Campèse et Decludt, 2000 ; Decludt *et al.*, 1999].

Pour l'année 2004, 1202 cas de maladie du Légionnaire ont été déclarés à l'InVS (Intitut National de Veille Sanitaire) et seulement dans 38% des cas, l'exposition à risque lors de la période d'incubation était connue (Tableau 1.17).

Ainsi, parmi les 1202 cas, 218 cas (18%) étaient des personnes exposées pendant leur voyage (hôtel, camping, ...) et 6% avaient séjourné dans un hôpital ou une clinique dont 44% étaient des cas nosocomiaux certains [Campèse *et al.*, 2005].

Tableau 1. 17 : Expositions à risque parmi les cas de légionellose survenus en France entre 2001 et 2004 [Campèse *et al.*, 2005].

	2001		**2002**		**2003**		**2004**	
	n	*%*	**n**	*%*	**n**	*%*	**n**	*%*
Total des cas déclarés	**807**		**1021**		**1044**		**1202**	
Expositions à risque								
Hôpital	105	*13*	100	*10*	89	*9*	75	*6*
Station thermale	7	*1*	9	*12*	7	*<1*	8	*<1*
Voyage	137	*17*	168	*17*	176	*17*	218	*18*
Hôtel-camping	88	*11*	118	*12*	135	*13*	139	*12*
Résidence temporaire	27	*3*	29	*3*	25	*2*	28	*2*
Autres types	30	*4*	21	*2*	16	*2*	51	*4*
Maison de retraite	18	*2*	35	*3*	45	*4*	66	*5*
Autres expositions	60	*7*	125	*12*	191	*18*	91	*8*
Total	**335**	***42***	**438**	***43***	**515**	***49***	**458**	***38***

L'incidence déclarée en France métropolitaine en 2004 était de 2,0 cas pour 100 000 habitants. L'évolution de la maladie était connue dans 83% des cas et la létalité était de 14%.

L'espèce et le sérogroupe étaient renseignés dans 97% des cas : l'espèce *L. pneumophila* représentait 99% et le SG1 90% des cas. [Campèse *et al.*, 2005]. Rappelons tout de même que le poids de *L. pneumophila* SG1 pourrait être exagéré par l'importance prise par le diagnostic de l'antigène urinaire qui à l'heure actuelle ne détecte que le SG1 de cette espèce.

2

MATERIEL ET METHODES

Sommaire

1 PRESENTATION DE L' ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE 73
1.1 DEFINITION DE L'ETUDE 73
1.2 POPULATION CIBLE : CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION 73
1.3 PROCEDURES DE RECRUTEMENT 74
1.4 DEROULEMENT GENERAL DE L'ETUDE AU SEIN D'UN ETABLISSEMENT 74
2 EVALUATION DE L'ETAT DE SANTE DES PERSONNES AGEES 75
2.1 ANTECEDENTS MEDICAUX 75
2.2 MANIFESTATIONS CLINIQUES AU COURS DU SUIVI 76
3 REALISATION DU DIAGNOSTIC RESEAU 77
3.1 SYSTEMES DE PRODUCTION ET DE DISTRIBUTION D'EAU CHAUDE 77
3.1.1 Etude de l'alimentation en eau froide 77
3.1.2 Etude des traitements d'eau 78
3.1.3 Production d'eau chaude sanitaire 79
3.1.4 Configuration du réseau 80
3.1.5 Points d'usage 80
3.2 MESURES SUR SITES ET RECHERCHE DE DONNEES 81
3.2.1 Relevés de température 81
3.2.2 TH et pH 81
3.2.3 Recherche de données 81
3.3 BASES REFERENTIELLES A LA DEFINITION DES POINTS CRITIQUES 82
4 DETERMINATION DES POINTS DE PRELEVEMENTS 83
4.1 RESEAU NON BOUCLE EN COLONNES MONTANTES OU DESCENDANTES 83
4.2 RESEAU BOUCLE EN COLONNES MONTANTES 84
4.3 RESEAU BOUCLE AVEC UNE BOUCLE CENTRALE 85
5 COLLECTE DES AEROSOLS 86
5.1 PRELEVEMENTS D'EAUX 86
5.2 PRELEVEMENTS D'AEROSOLS 86
5.2.1 L'impaction sur milieu solide 86
5.2.2 L'impaction en milieu liquide 87
5.2.3. La filtration 87
6 DETECTION ENVIRONNEMENTALE DE *LEGIONELLA* 88
6.1 MILIEUX DE CULTURE GELOSES POUR LA RECHERCHE DE *LEGIONELLA* 88

6.1.1 Gélose GVPC 88
6.1.2 Gélose BCYEα avec L-cystéine 88
6.1.3 Gélose BCYEα sans L-cystéine 88
6.2 TEST DE CONFIRMATION DES COLONIES DE *LEGIONELLA* 89
6.3 DENOMBREMENT DE LEGIONELLA CULTIVABLES 89
6.3.1 Echantillons d'eau 89
6.3.2 Echantillons d'aérosol 90
6.4 DENOMBREMENT TOTAL DES BACTERIES APRES MARQUAGE AU DAPI 90
6.4.1 Dénombrement des bactéries totales 90
6.5 DENOMBREMENT DE LEGIONELLA PAR HYBRIDATION *IN SITU* (FISH) 91
6.5.1 Solutions pour l'hybridation *in situ* 91
6.5.2 Dénombrement de *Legionella* par hybridation *in situ* 92
7 ANALYSES BIOLOGIQUES 93
7.1 RECHERCHE D'ANTIGENES URINAIRES 93
7.2 DOSAGE DES TITRES EN ANTICORPS ANTI-*LEGIONELLA* 93
8 ANALYSES STATISTIQUES 94
8.1 TESTS STATISTIQUES 94
8.2 ANALYSES QUALITATIVES 94
8.3 ANALYSES QUANTITATIVES 95

L'objectif de ce chapitre est de présenter les matériels et les méthodes employés durant ce travail. L'étude épidémiologique s'est déroulée pendant quatre mois au sein de maisons de retraite lorraines et a impliqué un suivi de l'état sanitaire de la cohorte ainsi constituée de personnes âgées volontaires. Pour chaque établissement étudié, la réalisation d'un diagnostic réseau permet de déterminer la criticité du réseau d'eau en terme de colonisation en *Legionella* et de définir les points de prélèvements (douches). Les échantillons d'eau et d'air ont été analysés de manière identique tout au long de ce travail et sont présentés ci après.

1 PRESENTATION DE L' ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE

1.1 DEFINITION DE L'ETUDE

L'étude épidémiologique a pour objectif de faire le lien entre la contamination de l'eau et de l'aérosol générés lors de douches, par *Legionella* dans les maisons et la survenue de la fièvre de Pontiac chez les personnes âgées résidentes.

Cette étude se présente comme une enquête longitudinale prospective pour le recueil des données cliniques (pendant quatre mois), avec une évaluation rétrospective de l'exposition des personnes incluses, puisque les mesures d'exposition à *Legionella* (sérologie, antigénurie, eau et aérosols) sont réalisées à la fin de ces 4 mois de suivi.

1.2 POPULATION CIBLE : CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION

La surveillance sanitaire porte sur les personnes âgées résidentes des maisons de retraite lorraines, exposées ou non à la bactérie pathogène *Legionella* lors des prises de douches dans les établissements de santé étudiés.

Toute personne âgée volontaire, incluse dans l'étude, répond aux trois critères suivants :

❶ Séjour continuel dans l'établissement, avec l'enregistrement, le cas échéant, des sorties (durée, lieu du déplacement et prises de douches à l'extérieur de l'établissement).

❷ Etre résident de l'établissement depuis plus de six mois (de manière à s'affranchir partiellement des affections contractées en dehors de l'établissement avant le séjour). Cette limite est basée sur la connaissance actuelle de la persistance des indicateurs immunologiques au niveau sérologique et

urinaire. La littérature fait état d'une disparition des anticorps anti-*Legionella* et des antigènes urinaires sur une période variable, mais pouvant atteindre 6 à 8 mois [Darelid *et al.*, 2003].

❸ Prise d'une douche hebdomadaire minimum, afin d'assurer une exposition potentielle des personnes âgées.

Les sujets âgés déclinant la participation à l'étude ont été exclus. Les personnes ne prenant pas de douches, pour des raisons médicales ou autres, ont été donc exclues de la population d'étude. Les sujets volontaires qui ont quitté définitivement l'établissement (généralement pour un passage en long séjour) avant la réalisation des prélèvements biologiques (sang et urine) n'ont pas été inclus dans l'analyse des relations entre exposition et infection.

1.3 Procedures de Recrutement

Le concours de la Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales (DRASS) et des Directions Départementales de Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS) des quatre départements lorrains (Moselle, Meurthe et Moselle, Vosges et Meuse) a permis d'organiser des réunions d'information avec les directeurs de maisons de retraite.

Au préalable, une présélection des établissements avait été réalisée, basée sur la nature des structures de santé (maisons de retraite médicalisées) afin de disposer des ressources internes pour assurer le suivi et l'enregistrement des données sanitaires, sur leur capacité d'hébergement (nombre de lits), et sur leur proximité géographique. L'historique des contaminations éventuelles en légionelles dans ces établissements n'a pas été vérifié au préalable pour ne pas biaiser les critères de sélection.

Ensuite, les directeurs des établissements ont été contactés au fur et à mesure afin de leur expliquer le projet et de solliciter leur participation. En cas de réponse positive, un ou plusieurs rendez-vous ont été organisés avec les équipes soignantes afin d'expliquer et de présenter plus précisément l'étude.

La participation d'une personne âgée à l'étude est définitive après présentation, compréhension et acceptation des critères de l'étude épidémiologique et de la signature d'un consentement éclairé.

1.4 Deroulement General de l'Etude au sein d'un Etablissement

Dans chaque établissement, l'étude épidémiologique dure quatre mois, durant lesquels, un registre recueillant les symptômes présentés par les personnes âgées est rempli quotidiennement par le personnel soignant. Des infirmières formées aux essais cliniques (CIC Nancy), en collaboration sur ce projet, s'assurent de la qualité du recueil de données, et sont chargées d'en vérifier l'exhaustivité sur chaque site.

Dès la première semaine d'étude dans l'établissement, ces infirmières effectuent un point téléphonique avec l'équipe soignante en charge du projet. Puis, leur visite est mensuelle, et un appel téléphonique alterné avec les visites permet de s'assurer du bon déroulement du projet dans chaque établissement et/ou de répondre aux questions pouvant survenir dans les centres en cours d'étude.

A la fin du suivi clinique, un diagnostic de l'état du réseau d'eau chaude de l'établissement est réalisé par un professionnel, dont les principales étapes sont présentées ci-après (*cf.* §3 de ce chapitre). Un des objectifs du « diagnostic réseau » est de définir les facteurs de risque de contamination par *Legionella* de chaque réseau d'eau chaude sanitaire des établissements sélectionnés, en évaluant les criticités (i) de l'alimentation en eau froide de la production d'eau chaude, (ii) de la production d'eau chaude (iii) du réseau de distribution d'eau chaude ainsi que (iv) des points d'usage. Sur sa base, nous avons défini les points de prélèvement (*cf.* §4) représentatifs de l'exposition des personnes âgées participant à l'étude. Il est à noter que tous les points de douche des personnes âgées volontaires ne pouvaient pas être échantillonnés du fait de contraintes logistiques et financières.
Ainsi, le diagnostic du réseau d'eau chaude sanitaire a permis de cartographier le réseau en termes de points critiques (structure, conception, mode de traitement de l'eau, température d'eau, ...). Il a aussi permis de déterminer les éventuelles zones à risque de contamination par les légionelles et d'identifier, parmi l'ensemble des douches de l'établissement, les points de prélèvements d'eau/aérosol correspondant à l'exposition des résidents volontaires. A l'issue du diagnostic, l'établissement a été décomposé en plusieurs secteurs s'il était jugé hétérogène du point de vue de la qualité du réseau et de la vulnérabilité de l'eau. Les personnes âgées résidentes et participant à l'étude ont été affectées à chaque secteur selon le lieu de leur prise de douche. A chaque secteur correspondait une douche jugée représentative du secteur et constituant le point de prélèvement.

2 EVALUATION DE L'ETAT DE SANTE DES PERSONNES AGEES

Lors des 4 mois d'étude épidémiologique, les informations sur l'état de santé des personnes âgées sont consignées sur deux registres tenus par le personnel soignant de la maison de retraite. Un registre est réservé aux antécédents médicaux et un registre est réservé aux signes cliniques présentés quotidiennement par les personnes âgées pendant les quatre mois d'étude.

2.1 ANTECEDENTS MEDICAUX

Le registre permettant de collecter les informations sur les antécédents médicaux des personnes âgées est présenté en annexe A1. Il a été généralement renseigné par le médecin coordinateur de la maison de retraite lors de l'inclusion des volontaires.

Il fournit les informations générales sur la personne âgée incluse dans l'étude : date de naissance, sexe, date d'entrée et le cas échéant de sortie définitive de l'établissement, tabagisme (actuel ; ancien avec précision des quantités).

Les antécédents médicaux renseignés peuvent être répartis en 5 groupes :
❶ Les pathologies respiratoires qui regroupent les pneumopathies, l'asthme, les BPCO (broncho-pneumopathies chroniques obstructives), les embolies pulmonaires, insuffisances respiratoires chroniques. Ces pathologies altèrent le poumon et en particulier l'épithélium des voies respiratoires qui est une barrière naturelle de protection contre les bactéries.

❷ Les pathologies influant sur l'état immunitaire du patient (alcoolisme, diabète, cancer et hémopathie).

❸ Les pathologies cognitives (démence, débilité, Alzheimer et Parkinson...) provoquent à un stade avancé un risque accru de trouble de la déglutition, une diminution de l'efficacité de la toux et de l'expectoration, entraînant un risque accru de pneumopathie d'inhalation.

❹ Les pathologies cardiovasculaires (insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle, l'artérite, les troubles du rythme, AVC (accidents vasculaires cérébraux...) peuvent entraîner une baisse de l'autonomie (surtout pour les AVC) et une moins bonne tolérance aux infections (exacerbation des symptômes).

❺ Les autres pathologies sont regroupées sous le terme de comorbidités (pathologies rénales, hépatiques, neurologiques -non cognitives- psychiatriques, ...).

2.2 Manifestations Cliniques au Cours du Suivi

Le registre permettant de collecter les signes cliniques au cours des quatre mois de suivi est présenté en annexe A1. Il est rempli de manière quasi quotidienne par le personnel soignant de l'établissement et sa qualité était périodiquement vérifiée par les infirmières du CIC.

Sont tout d'abord renseignés, les symptômes tels que la fièvre $\geq$ 38°C, toux, myalgies, céphalées, frissons, diarrhée, vomissements, vertiges, asthénie, et autres symptômes pouvant évoquer une infection à *Legionella* chez les personnes âgées (essoufflement, dyspnée, douleurs localisées ou diffuses notamment articulaires ou à la poitrine, raideur de la nuque, nausées, gorge endolorie, rhume, photophobie, sensibilité cutanée, rash, anorexie, confusion, insomnie, cauchemars, irritabilité, difficultés de concentration et de mémorisation).

Il recueille aussi, de manière journalière, la prise de traitement antibiotique, de traitement immunitaire (corticoïdes).

Les modalités de la toilette des personnes inclues sont ainsi décrites quotidiennement : douche ou toilette au lavabo/lit et lieu de prise de douche. L'hypothèse étant que ces données influenceraient, qualitativement ou quantitativement, l'exposition. De plus, des informations sont demandées sur les sorties des patients lorsqu'elles dépassent la demi-journée : lieu de sortie (famille, hôpital, vacances), éventuelle prise de douche lors de cette sortie. Ces données nous permettent de connaître les autres lieux d'exposition potentielle des participants.

3 REALISATION DU DIAGNOSTIC RESEAU

Le diagnostic réseau est effectué par un professionnel selon un protocole défini faisant l'objet d'un secret industriel et de ce fait nous ne pouvons pas le faire figurer dans ce manuscrit. Mais les principes et les étapes du diagnostic réseau sont détaillés et développés ci après. Il s'agit d'une démarche basée sur des critères de présence/absence des différents éléments considérés lors d'une ou plusieurs visites par le professionnel sur site ; l'appréciation est donc majoritairement visuelle ; seules des mesures des température, de TH et pH de l'eau sont réalisées sur site et permettent d'affiner ce diagnostic.
Le diagnostic est focalisé sur l'étude des systèmes de production et de distribution d'eau, c'est-à-dire des canalisations, des accessoires et des équipements, du point de vue de la conception, de la mise en œuvre, de l'exploitation et de la maintenance. Il permet donc de rechercher, d'identifier et de caractériser les éléments critiques, c'est-à-dire l'ensemble des paramètres pouvant avoir une influence sur les risques de contaminations par *Legionella.*

3.1 SYSTEMES DE PRODUCTION ET DE DISTRIBUTION D'EAU CHAUDE

L'étude des systèmes de production et de distribution de l'eau chaude se compose en cinq étapes organisées, d'amont en aval, de la production au point d'usage : (i) l'étude de l'alimentation en eau froide du système de production ; (ii) la vérification des traitements d'eau en place (adoucisseur, filmogène, chloration continue) et leur pertinence au regard de la qualité des eaux ; (iii) les systèmes de production d'eau chaude sont diagnostiqués ; (iv) l'étude de la configuration générale du réseau et (v) l'étude des points d'usage.

3.1.1 Etude de l'alimentation en eau froide

Dans une problématique *Legionella*, divers paramètres sont recherchés (présence ou absence) pour leur rôle potentiel sur la colonisation par *Legionella.*

Tout d'abord, la présence d'un compteur d'eau sur l'alimentation en eau froide est notifiée car elle permet de vérifier, en cas de traitement d'eau, le bon ajustement des doses injectées dans le réseau d'eau en fonction de la consommation en eau de l'établissement. Dans ce cas, ce n'est évidemment pas la

présence ou l'absence du compteur qui peut influer sur *Legionella* mais elle peut retentir indirectement sur la bonne gestion des traitements d'eau et donc sur la qualité des canalisations au cours du temps.

Au sein même du local de chaufferie est vérifié le calorifugeage[1] de la canalisation d'eau froide alimentant le système de production de l'eau. Ce local, connu pour avoir une température ambiante élevée du fait des systèmes de production d'eau chaude et de chauffage, nécessite un calorifugeage[1] intégral de la canalisation d'eau froide, sans quoi celle-ci pourra subir un réchauffement, propice à *Legionella* et donc à risque.

3.1.2 Etude des traitements d'eau

Les traitements d'eau (seuls ou concomitants) peuvent être de 3 sortes : traitement anti-tartre (mise en place d'un adoucisseur), traitement anti-corrosion (mise en place d'un filmogène) et traitement bactéricide (mise en place d'une chloration en continu).

3.1.2.1 Traitement anti-tartre

Le traitement anti-tartre employé est un adoucisseur. Le diagnostic réseau permet de vérifier à la fois la nature (provenance, norme NF), la dose injectée, l'efficacité mais aussi l'utilité du traitement au niveau de chaque réseau d'eau afin de garantir le plus longtemps possible un dépôt de tartre limité sur les canalisations. En cas de besoin d'un adoucisseur sur un réseau mais d'absence d'installation (laissant suggérer dépôt de tartre propice à *Legionella*), ce paramètre à risque est notifié.

3.1.2.2 Traitement anti-corrosion

Le traitement anti-corrosion employé est un filmogène. Tout comme les autres traitements d'eau, la justification, le réglage et l'entretien du filmogène est vérifié durant le diagnostic réseau. Par ailleurs, afin d'estimer sir les doses injectées sont adéquates, la présence/absence d'un compteur à impulsion contrôlant l'injection de produit filmogène est répertoriée.

3.1.2.3 Traitement bactéricide

Le traitement bactéricide employé dans certains des établissements étudiés est la chloration en continu. Les doses injectées mais aussi le chlore résiduel sont monitorés, dans la mesure du possible lors du diagnostic réseau, afin de prévenir tout risque de colonisation par *Legionella.*

[1] Isolation thermique des canalisations.

3.1.3 Production d'eau chaude sanitaire

Au niveau du local de production d'eau chaude sanitaire, le relevé technique du diagnostic est réalisé à la fois au niveau du système de production d'eau chaude, du bouclage[2] du réseau et du réseau d'eau dans le local de production.

3.1.3.1 Système de production d'eau chaude

La présence d'un échangeur à plaques, système instantané de production d'eau chaude est qualifié de protecteur contre *Legionella*. Par contre, du fait du risque de stagnation d'eau réchauffée, propice à *Legionella*, la présence d'un ballon d'accumulation ou d'un système de production semi-instantané (couplant un échangeur à plaques et un ballon) est considérée comme à risque.
Le surdimensionnement du ballon d'accumulation, ne fonctionnant d'ailleurs guère dans certains établissement (juste une réserve) est considéré à risque pour la même raison qu'explicité au-dessus.

3.1.3.2 Bouclage[2] d'eau chaude sanitaire

La présence ou l'absence de trois éléments est observée : une pompe de circulation de secours ou robinet raccordé à une évacuation, un robinet de chasse sur le retour d'eau chaude sanitaire, et un clapet de non retour[3] en aval du circulateur (Figure 2.1).

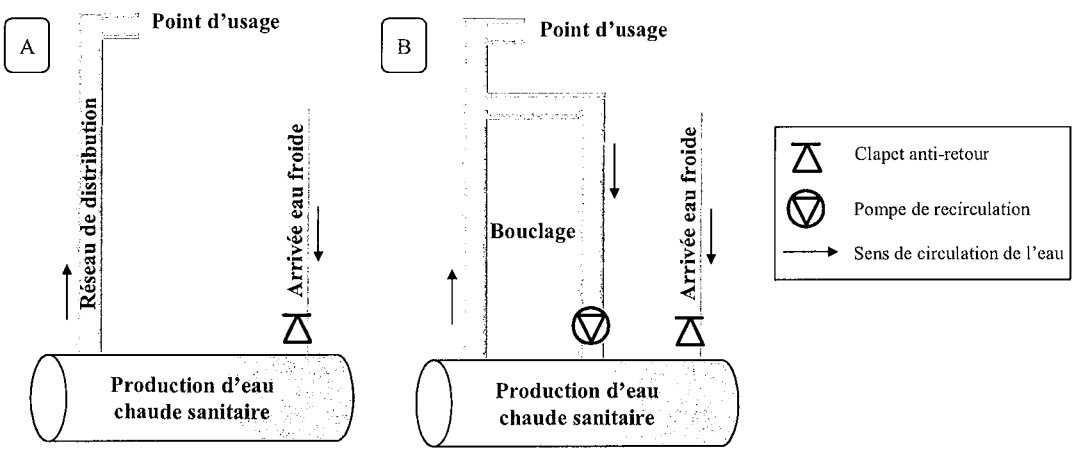


Figure 2. 1 : Schéma de deux types de réseau d'eau chaude – A : réseau non bouclé ; B : réseau bouclé.

3.1.3.3 Réseau d'eau chaude sanitaire dans le local de production

Dans le local de production d'eau chaude sanitaire, afin de s'assurer du bon fonctionnement du système de production d'eau chaude, la présence d'un thermomètre sur le départ et le retour de distribution, ou la

[2] Le bouclage consiste à réaliser un réseau d'eau supplémentaire qui reprend l'eau au plus près du point d'usage et l'achemine soit vers la production soit vers un réchauffeur de boucle ; processus permettant de maintenir l'eau en circulation.
[3] Le clapet de non retour permet d'éviter les retours d'eau dans les canalisations, c'est un dispositif anti-pollution.

présence de relevés thermiques automatisés avec archivage, permet de garantir l'attention et la vérification faites au niveau de la température de départ d'eau chaude.

Afin de permettre l'analyse de l'eau chaude en production, la présence d'un point de prélèvement sur le départ et le retour d'eau chaude sanitaire est conforme à la législation [DGS, 2002]. La présence de bras morts[4] sur le réseau d'eau chaude du local de production est caractérisée à risque de *Legionella* pour les raisons précédemment évoquées (*cf.* § 3.1.1).

Une attention particulière est portée à l'état des canalisations et notamment à la présence de corrosion, ou à la mixité de matériaux métalliques (acier galvanisé et cuivre), ou à un calorifugeage commun entre eau froide et eau chaude. La présence d'un de ces éléments est propice à la présence de *Legionella* et donc considéré à risque.

De la même manière, la présence d'un mitigeur sur le départ production sans traitement préventif (chlore ou U.V.), est un facteur favorisant la colonisation de *Legionella* et sera considéré comme élément à risque.

3.1.4 Configuration du réseau

La configuration du réseau peut-être connue par la présence de plans de la distribution à jour permettant ainsi de caractériser l'ensemble du réseau d'eau de l'établissement : type de bouclage[2] ; présence de bras morts[4], … .

Les matériaux et l'état des canalisations sont répertoriés : l'entartrage et/ou la corrosion, ainsi que la présence et le nombre de bras morts[4] sur les réseaux d'eau, sont caractérisés à risque de *Legionella.* Par contre, l'existence d'un calorifugeage[1] en bon état sur les colonnes d'eau chaude séparé de celui des colonnes d'eau froide, sur l'ensemble du réseau d'eau, est protecteur de *Legionella.*

Afin de garantir l'évacuation de dépôts et d'eau stagnante, la présence de dégazeur[5] en point haut des colonnes montantes[6], et la présence de vanne de chasse en points bas des colonnes d'eau, permet de se prémunir contre *Legionella.* Leur absence est donc à risque.

3.1.5 Points d'usage

L'étude des points d'usage se fait à la fois sur les zones potentielles de stagnation, mais également sur les éviers, lavabos, baignoires et douches, ainsi que les éléments dits « à risques » qui sont les baignoires à remous, ou de balnéothérapie, les fontaines décoratives et les lave bassins.

[4] Canalisation sans point d'usage à son extrémité.
[5] Appareil automatique ou manuel permettant l'évacuation des gaz accumulés au point haut d'une canalisation.
[6] Dans un immeuble, canalisation, généralement verticale, destinée à desservir en eau les différents étages ou pièces.

Comme pour les autres catégories du réseau d'eau des établissements, la présence et le nombre de tuyaux borgnes ou de bras morts sur les réseaux d'eau, sont caractérisés à risque de *Legionella.*

Afin de garantir le suivi des bonnes pratiques indiqué dans la réglementation pour les points d'usage (démontage et nettoyage régulier des flexibles et des pommeaux de douche), la présence de flexibles/pommeaux fixes sur les douches, ou de filtres terminaux non entretenus est noté lors du diagnostic et est considéré comme à risque de *Legionella.*

Pour les fontaines décoratives, et les lave-bassins, la présence d'une attestation de conformité sanitaire ou d'une protection antipollution est observée.

3.2 MESURES SUR SITES ET RECHERCHE DE DONNEES

3.2.1 Relevés de température

Parallèlement à l'observation des différents éléments composant le réseau d'eau chaude sanitaire, des mesures et des relevés de températures sont réalisés (si présence de thermomètre) sur les ballons de stockages, le départ eau chaude sanitaire, le départ eau mitigée et le retour d'eau chaude.
Environ dix mesures sont réalisées sur le réseau d'eau, au niveau de la distribution, en ouvrant le robinet d'eau chaude à son maximum. Les températures sont relevées après une minute d'écoulement d'eau, donnant une bonne définition de l'équilibrage du réseau. En effet, un long temps d'écoulement d'eau pour obtenir de l'eau chaude sanitaire signifie des problèmes d'équilibrage[7] (réglage des vannes, entartrage, diamètre des canalisations....).
Ces températures sont relevées aléatoirement sur le réseau, à tous les étages et au minimum une fois sur chaque colonne d'eau. Elles sont relevées à partir de la sonde de température du pHmètre 330i (WTW).

3.2.2 TH et pH

Une mesure de dureté totale est réalisée sur l'eau chaude au point d'usage pour contrôler le réglage de l'adoucisseur et en valider sa nécessité par rapport à la qualité de l'eau. Cette mesure est réalisée avec un kit commercial avec une valeur approximative à +/- 1°F (ref. 1.11156.001, Merck).
La mesure de pH est réalisée en même temps que le relevé de température (appareil 330i, WTW).

3.2.3 Recherche de données

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau potable d'alimentation sont recherchées auprès des DDASS ou des distributeurs d'eau afin de s'assurer de la nécessité ou non d'un ou plusieurs traitements

[7] Opération consistant à harmoniser le débit dans un réseau d'eau de telle sorte que chaque tronçon véhicule le débit souhaité.

d'eau. Les paramètres suivants sont demandés : calcium, TH, TAC, conductivité, pH, chlorures et sulfates.

L'analyse de ces paramètres par le professionnel lui permet de caractériser globalement le pouvoir agressif et/ou corrosif de l'eau, et d'en déduire la pertinence de la mise en place des traitements.

3.3 Bases Referentielles a la Definition des Points Critiques

Les éléments critiques du réseau d'eau répertoriés lors du diagnostic, exposés ci-dessus, servent à l'établissement de points critiques à la fois sur les systèmes de production et de distribution d'eau chaude mais également sur les opérations de maintenance et leur fréquence. D'ailleurs un tableau synthétisant les principaux points critiques retenus dans l'étude est présenté dans le chapitre 3 (*cf.* §3.3 ; Tableau 1)

Cette caractérisation des points critiques se fait en fonction des recommandations des textes réglementaires en vigueur et cités ci-dessous :

- **Circulaire DGS n°2002/273 du 2 mai 2002**, relative à la diffusion du rapport du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France relatif à la gestion du risque lié aux légionelles.
- **Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243 du 22 avril 2002**, relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.
- **Décret 2001-1220 du 20 décembre 2001**, relatif aux eaux destinées à la consommation humaine.
- **Guide « Gestion du risque lié aux légionelles » du CSHPF de novembre 2001**, comportant des recommandations préventives visant à limiter le risque lié aux légionelles et destiné aux gestionnaires des établissements recevant du public et des bâtiments d'habitation
- **Circulaire DGS n°98/771 du 31 décembre 1998**, relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans celles des bâtiments recevant du public.
- **Circulaire DGS/VS 2 n°97-311 du 24 avril 1997**, relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose.
- **Guide technique n°1 bis de 1992**, relatif à la qualité des installations de distribution d'eau destinée à la consommation humaine à l'intérieur des bâtiments.
- **Circulaire du 7 mai 1990**, relative aux produits et procédés de traitements des eaux destinées à la consommation humaine.
- **Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989,** relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles.
- **Circulaire DGS/PGE/1.D n° 593 du 10 avril 1987**, relative au guide technique n°1 concernant la protection sanitaire des réseaux de distribution d'eau de consommation humaine.
- **Norme NF P40-201 (DTU 60.1) additif n°4 de février 1977**, relatif à l'installation de distribution d'eau en tube d'acier à l'intérieur des bâtiments.

4 DETERMINATION DES POINTS DE PRELEVEMENTS

La détermination des points de prélèvements est réalisée à l'aide d'un protocole prédéfini. Il est bien entendu impossible d'échantillonner chaque point d'eau relié à chaque volontaire au sein des divers établissements, pour les raisons précédemment évoquées (*cf.* § 1.4).

L'objectif est de caractériser l'exposition aux légionelles d'aérosols d'eaux chaudes en établissement collectif. La détermination des points de prélèvements se fait en plusieurs étapes :

❶ Localisation sur plans de l'organisation du réseau : colonnes[7], bouclage[2] ;

❷ Localisation des volontaires à l'étude et de leur point de douche ;

❸ Application des règles de décision en fonction de la configuration du réseau ;

❹ Détermination des points de prélèvements caractéristiques de l'exposition des volontaires au projet.

Les règles de décision pour la détermination des points de prélèvements sont fonction de la configuration du réseau et peuvent être séparées en trois groupes de décisions. Ces règles sont applicables pour des réseaux parfaitement dimensionnés, où l'équilibrage[7]est correct et la vitesse de circulation de l'eau suffisante.

La détermination des points de prélèvements caractéristiques de l'exposition des sujets participant à l'étude, repose sur la localisation des volontaires (PA_x) à l'étude et de leur point de douche (x).

4.1 RESEAU NON BOUCLE EN COLONNES MONTANTES OU DESCENDANTES

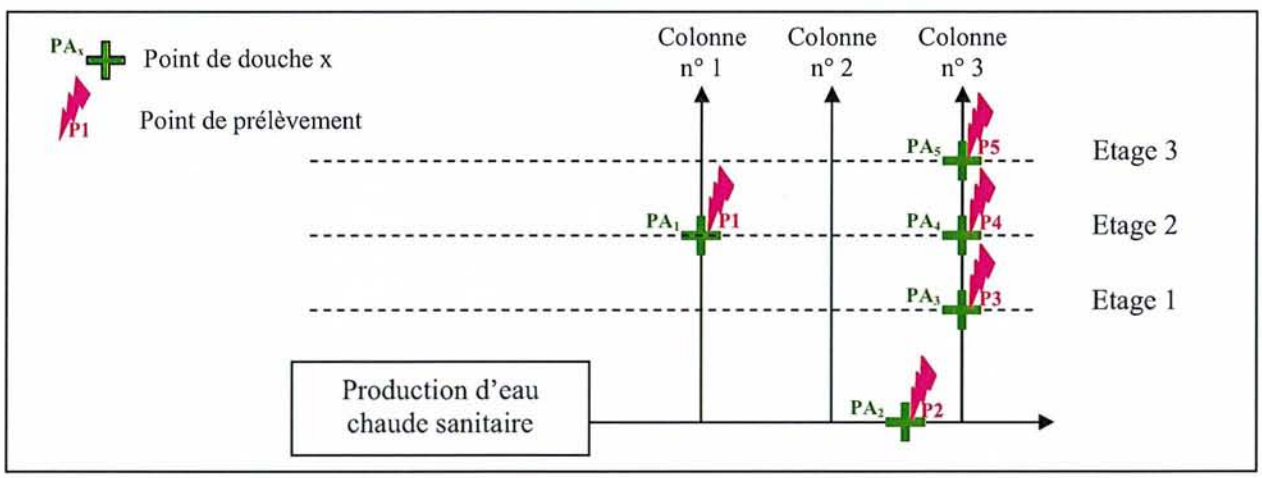


Figure 2. 2 : Exemple d'organisation du réseau et de localisation des points de douches utilisés par les volontaires de l'étude sur un réseau non bouclé en colonnes montantes[7].

Sur un réseau non bouclé en colonnes montantes (ou descendantes), la circulation n'est pas identique dans les différentes colonnes. C'est pourquoi, pour chacun des points de douche, dans le cas présenté par la figure 2.2, un point de prélèvement est préconisé.

L'exposition attribuée aux personnes utilisant le point de douche (x) correspondra au résultat du prélèvement d'eau et/ou d'aérosol. Cependant, dans le cas d'un réseau bien entretenu, avec des purges quotidiennes réalisées sur chaque colonne, le nombre de point de prélèvement peut être allégé.

4.2 Reseau Boucle en Colonnes Montantes

Sur un réseau bouclé, la circulation de l'eau chaude est normalement homogène au niveau d'une même colonne. On peut donc considérer que l'exposition est identique au niveau de tous les points d'usage d'une même colonne, à condition que ces points soient tous utilisés régulièrement et soient équipés de la même manière (pommeaux identiques). C'est pourquoi, dans le cas présenté par la figure 2.3, on peut considérer que 3 points de prélèvements suffisent à caractériser l'exposition des volontaires à 5 points de douche.

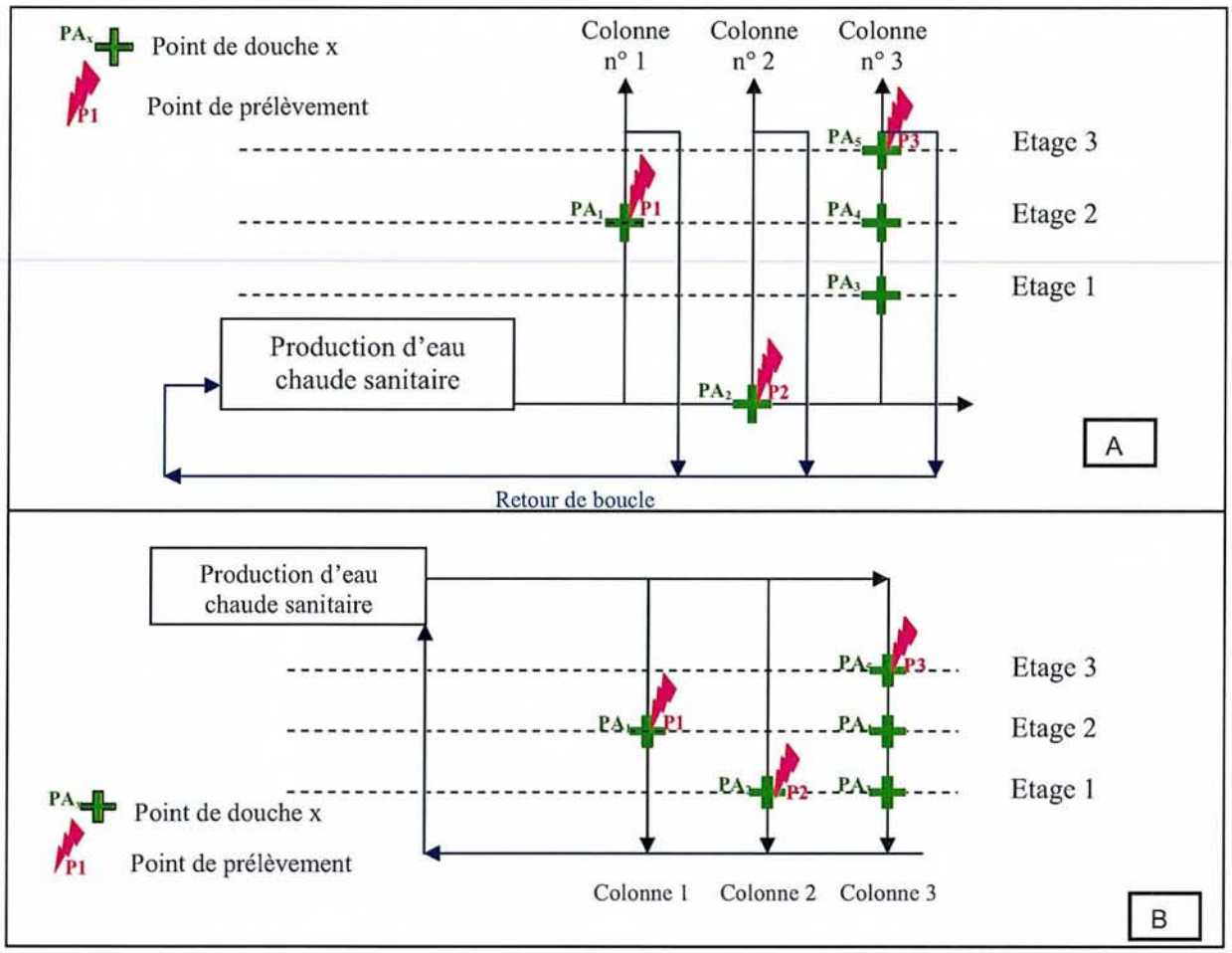


Figure 2. 3 : Exemple d'organisation du réseau et de localisation des points de douches utilisés par les volontaires de l'étude sur un réseau bouclé - A : en colonnes montantes[7] ; B : en parapluie[8].

[8] Dans ce type de réseau une seule colonne d'eau est montante, les autres sont descendantes.

La configuration du réseau présenté dans la Figure 2.3a est équivalente à un réseau en chandelle[9]. Dans ce cas la détermination des points de prélèvements se fait de façon similaire. Ainsi l'exposition aux différents points de douche, dans les deux cas, est définie de la manière suivante :

Exposition (PA_1) = Exposition (P1)

Exposition (PA_2) = Exposition (P2)

Exposition (PA_3) = Exposition (PA_4) = Exposition (PA_5) = Exposition (P3)

4.3 RESEAU BOUCLE AVEC UNE BOUCLE CENTRALE

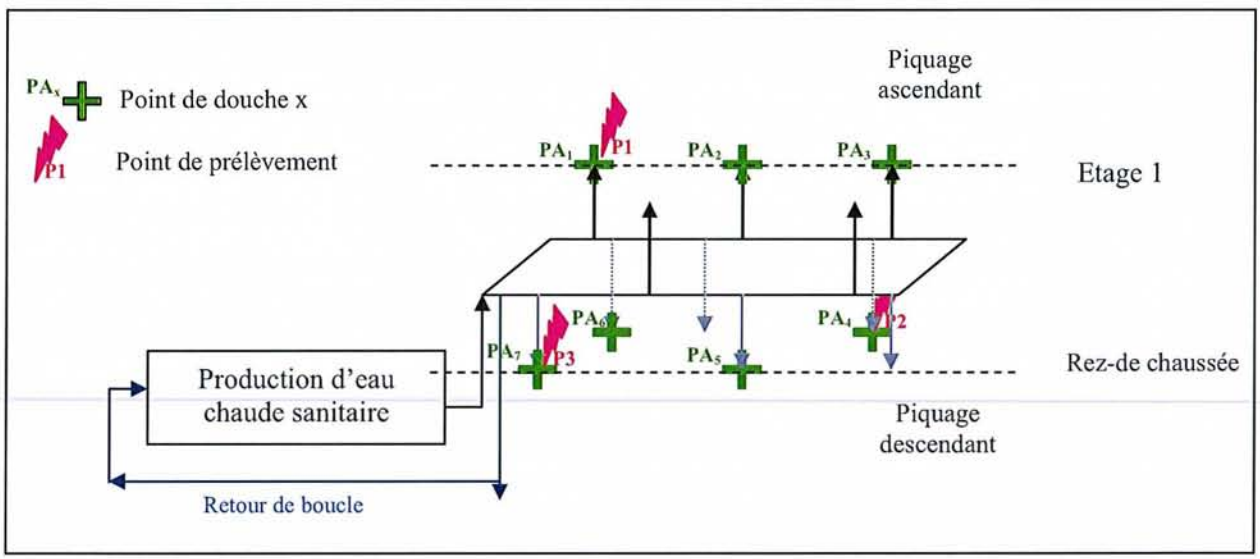


Figure 2. 4 : Exemple d'organisation du réseau et de localisation des points de douches utilisés par les volontaires de l'étude sur un réseau bouclé avec une boucle centrale.

Au niveau de la boucle centrale, nous pouvons considérer que la circulation de l'eau chaude est homogène. Si les piquages servent à alimenter un seul étage supérieur et un étage inférieur, alors nous pouvons considérer que le point de prélèvement situé sur un tronçon (coté du parallélépipède) particulier sera représentatif de tous les points situés sur ce même tronçon.

Se contenter d'un seul point de prélèvement par tronçon ne serait pas très judicieux pour caractériser l'exposition de chaque niveau. C'est pourquoi, un point par niveaux et sur chaque tronçon semble être un bon compromis. Cependant, si la boucle centrale sert à alimenter plusieurs étages inférieurs ou supérieurs, à partir de colonnes descendantes ou ascendantes non bouclées, alors, pour les étages supérieurs, un point de prélèvement par point de douche par colonne et par niveau sera nécessaire. De façon similaire, pour les étages inférieurs, un point de prélèvement par point de douche par colonne et par niveau sera nécessaire.

[9] Le bouclage est situé sur chaque colonne d'eau.

Dans le cas présenté par la Figure 2.4, l'exposition aux points de douche est déterminée de la manière suivante :

Exposition (PA_1) = Exposition (PA_2) = Exposition (PA_3) = Exposition (P1)

Exposition (PA_6) = Exposition (PA_4) = Exposition (P2)

Exposition (PA_7) = Exposition (PA_5) = Exposition (P3)

5 PRELEVEMENTS DES EAUX CHAUDES ET DES AEROSOLS

5.1 PRELEVEMENTS D'EAUX

Un premier prélèvement d'eau est effectué dès la mise en fonctionnement de la douche dans une bouteille stérile contenant du thiosulfate de sodium (20 mg) afin de neutraliser un éventuel résiduel de chlore dans l'eau. Il correspond au « 1er jet ». Ce premier prélèvement, fait sans flambage, à pression et température d'eau chaude maximum, est d'environ de 300 mL : il correspond à vider le piquage de canalisation qui alimente le robinet.

Après 7 minutes d'écoulement de la douche, un deuxième prélèvement d'eau dit « purge » est réalisé [EPA, 1997]. Un duplicat de ces prélèvements d'eau a été réalisé à deux jours d'intervalle au même point de douche et dans les mêmes conditions que spécifié ci-dessus.

5.2 PRELEVEMENTS D'AEROSOLS

Trois principes d'échantillonnage parmi les plus usités sont employés : l'impaction solide, l'impaction liquide et la filtration. Les conditions opératoires sont synthétisées dans le tableau 2.1.

5.2.1 L'impaction sur milieu solide

Les bactéries aérosolisées sont prélevées avec un impacteur à crible type MAS100®. Ce dernier est composé de 400 trous disposés uniformément en cercle sur la surface de collecte. L'air, aspiré à raison de 100 L.min^{-1}, est accéléré par passage au travers de ces orifices. En fonction de leur inertie, les particules entraînées par le flux d'air peuvent, soit suivre les lignes de courant, soit s'impacter sur la surface de collection (gélose) placée au-dessous de la plaque perforée pour celles possédant l'inertie la plus importante. Dans nos essais, cette surface est une gélose GVPC spécifique des légionelles permettant d'évaluer directement la concentration des bactéries viables aérosolisées (UFC.m^{-3} d'air prélevé).

Pour se situer dans les conditions d'efficacité spécifiées par le constructeur, la distance entre la base de la boîte de Pétri et la surface du milieu nutritionnel doit être de 9,5 mm, ce qui correspond à un volume de gélose de 20 mL exactement mesuré, afin de s'assurer de l'impaction des bactéries *Legionella*.

Tableau 2. 1 : Conditions opératoires pour le prélèvement des aérosols microbiologiques.

	Impaction sur milieu solide	**Impaction en milieu liquide**	**Filtration**
	MAS100®, Merck.	BioSampler® SKC, Arelco	Cassettes, Millipore
Nom du dispositif commercialisé			
Débits de prélèvements	100 $L.min^{-1}$	13 $L.min^{-1}$	10 $L.min^{-1}$
Temps de prélèvements	30 secondes et 5 minutes	15 minutes	30 à 60 minutes
Supports de collecte	Gélose GVPC	Eau distillée stérile	Membrane en polycarbonate (∅pore = 0,2 µm)
Méthodes analytiques	culture	Culture et hybridation *in situ*	Hybridation *in situ*

5.2.2 L'impaction en milieu liquide

Lors d'une impaction en milieu liquide, l'air est aspiré au travers d'un tube capillaire, puis propulsé à la surface d'une suspension liquide. L'appareillage employé est le BioSampler®, dont le principe de fonctionnement consiste en une impaction tangentielle des particules à la surface du milieu de collecte. Le débit de prélèvement, de 13 $L.min^{-1}$, est fixe et vérifié au laboratoire [Jensen *et al.*, 1994]. Dans nos essais, le milieu de recueil consiste en 20 mL d'eau distillée stérile apyrogène.

5.2.3 La filtration

La collection des particules, par filtration, repose sur l'action simultanée de différents mécanismes (impaction inertielle, interception, diffusion) dont l'importance relative dépend de la dimension des particules et de la vitesse de l'écoulement. Dans le cas d'une particule de 1 µm, les deux mécanismes intervenant sont l'interception et l'impaction.

L'air est aspiré au travers d'un média filtrant qui assure la séparation des aérosols du fluide vecteur. Le support filtrant employé dans cette étude est une membrane de polycarbonate, de 0,8 µm de diamètre de pores.

6 DETECTION ENVIRONNEMENTALE DE *LEGIONELLA*

6.1 MILIEUX DE CULTURE GELOSES POUR LA RECHERCHE DE *LEGIONELLA*

6.1.1 Gélose GVPC

La gélose GVPC est un agar sélectif pour la mise en évidence de *Legionella* dans les échantillons environnementaux (eau ou aérosol). Les différents antibiotiques présents dans la gélose, jouent le rôle d'inhibiteurs de la croissance des bactéries autochtones des réseaux d'eau potable.

La gélose GVPC est constituée pour un litre d'eau déminéralisée de 25 g de gélose de base CYE (Oxoïd, CM655), 10 g d'extrait de levure, 2 g de charbon activé et 13 g d'agar. Le pH avant autoclavage est de 6,9±0,2. La gélose est stérilisée par autoclavage (121°C, 15 min). Ensuite, 270 mL de ce milieu CYE sont mélangés aseptiquement à 30 mL de supplément SR110C (Oxoïd) et 5,4 mL de supplément SR152E (Oxoïd) (Tableau 2.2). Après homogénéisation, la gélose est répartie dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre et stockée à 4-10°C pendant 1 mois maximum.

Tableau 2. 2 : Composition des suppléments nécessaires à la croissance de Legionella (SR110C et SR152E pour 1 litre d'eau distillée).

Supplément SR110C (Oxoïd)		Supplément SR152E (Oxoïd)	
Composé	**Quantité**	**Composé**	**Quantité**
Pyrophosphate ferrique	0,5 g	Glycine	150 g
L-cystéine	0,8 g	Polymyxine B SO_4	4000 UI
α-cétoglutarate	2 g	Vancomycine	0,05 g
Tampon ACES/KOH	20 g	Cycloheximide	4 g

6.1.2 Gélose BCYEα avec L-cystéine

Après croissance de colonies bactériennes sur gélose GVPC, les colonies suspectées être des légionelles sont repiquées sur gélose BCYEα avec L-cystéine et sur gélose BCYEα sans cystéine.

Le milieu gélosé BCYEα avec L-cystéine (Broth Charcoal Yeast Extract) est spécifique de la détection de *Legionella*.

La préparation du milieu se fait en mélangeant 25 g de gélose de base CYE (Oxoïd) avec 900 mL d'eau déminéralisée. Le pH avant autoclavage est de 6,9±0,2. Le milieu est alors autoclavé 15 minutes à 121°C. Ensuite, 270 mL de ce milieu CYE sont mélangés aseptiquement à 30 mL de supplément SR110C (Tableau 2.2). Après homogénéisation, la gélose est répartie dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre et stockée ainsi à 4-10°C pendant 1 mois maximum.

6.1.3 Gélose BCYEα sans L-cystéine

La préparation du milieu se fait en mélangeant 25 g de gélose de base CYE avec 900 mL d'eau déminéralisée. Le pH avant autoclavage est de 6,9±0,2.

Le milieu est alors autoclavé 15 minutes à 121°C. Ensuite, 270 mL de ce milieu CYE sont mélangés aseptiquement à 30 mL de supplément SR175A (Tableau 2.3). Après homogénéisation, la gélose est répartie dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre et stockée à 4-10°C pendant 1 mois maximum.

Tableau 2. 3 : Composition du supplément spécifique à la non cultivabilité de Legionella (SR175A).

Supplément SR175A (Oxoïd)	
Composé	**Quantité ($.L^{-1}$ eau distillée)**
Pyrophosphate ferrique	2,5 g
α-cétoglutarate	10 g
Tampon ACES/KOH	100 g

6.2 Test de Confirmation des Colonies de *Legionella*

Après incubation, les colonies suspectes (grises, amorphes et ayant un aspect dit en « verre brisé ») détectées sur GVPC sont comptées et repiquées sur gélose spécifique (BCYE avec L-cystéine) et sur milieu non spécifique (BCYE sans L-cystéine) pour permettre une première identification du genre *Legionella* : une colonie se développant sur BCYE avec L-cystéine et pas sur BCYE sans L-cystéine est considérée comme appartenant au genre *Legionella* ; les autres cas de figure ne correspondent pas à des légionelles. Pour ces légionelles présumées, le test d'immunofluorescence directe (BIO-RAD, MONOFLUO™ *Legionella pneumophila* IFA Test kit) et le sérotypage par agglutination au latex (OXOÏD, *Legionella Latex Test*) permettent par la suite l'identification et la classification d'espèce (*L. pneumophila* ou *Legionella sp.*) et de sérogroupes.

6.3 Denombrement de *Legionella* Cultivables

La détection des légionelles cultivables a été réalisée selon la norme AFNOR [2003]. Les colonies suspectes, dites en « verre brisé », sont dénombrées et identifiées à la fois sur les échantillons d'eau et d'aérosols. Les résultats sont alors exprimés en Unité Formant Colonies par litre d'échantillon (eau ou air).

6.3.1 Echantillons d'eau

Pour chaque prélèvement d'eau de douche, le dénombrement de légionelles cultivables est effectué.
Sur l'échantillon appelé « 1er jet », deux ensemencements directs de 0,1 mL et deux ensemencements dilués au dixième avec de l'eau distillée stérile apyrogène (EDSA) de 0,1 mL sur gélose GVPC sont réalisés. Les boîtes sont incubées 8 à 10 jours à 37°C±1°C et les colonies suspectes apparues sont comptées et repiquées sur gélose spécifique : BCYE avec L-cystéine et BCYE sans L-cystéine pour permettre une première identification du genre *Legionella*.

Sur l'échantillon « purge », 500 mL sont utilisés pour dénombrer les légionelles cultivables selon la méthode de concentration décrite dans la norme AFNOR [2003] et deux ensemencements directs de 0,1 mL et deux ensemencements dilués au dixième avec de l'eau distillée stérile apyrogène (EDSA) de 0,1 mL sur gélose GVPC sont réalisés.
La limite de détection des légionelles cultivables est de 100 UFC-*Legionella*.L^{-1} eau et pour l'ensemencement direct de 5.10^3 UFC-*Legionella*.L^{-1} eau.

6.3.2 Echantillons d'aérosol

Le dénombrement de légionelles cultivables a été effectué pour les échantillons issus de prélèvement d'aérosol par impaction sur gélose et impaction en milieu liquide. Pour les prélèvements par impaction sur gélose (biocollecteur MAS100®), les bactéries de l'aérosol sont directement collectées sur le milieu gélosé GVPC. Les géloses ainsi récupérées sont alors incubées 8 à 10 jours à 37°C±1°C et le dénombrement et l'identification de *Legionella* s'effectue de la même manière que décrit pour les échantillons d'eau (§ 6.2).

Pour les prélèvements par impaction en milieu liquide (biocollecteur impinger SKC), les bactéries de l'aérosol s'impactent dans 20 mL d'EDSA. La détection des légionelles cultivables s'est effectuée par concentration du volume total collecté par filtration sur une membrane blanche en polycarbonate de 0,2 µm de porosité. Les bactéries sont remises en suspension par traitement aux ultrasons de la membrane pendant 2 minutes dans 3 mL d'eau de collecte. Puis, 0,1 mL du concentrat est ensemencé en duplicat sur une gélose GVPC. Après incubation des boîtes pendant 8 à 15 jours à 37°C±1°C, le dénombrement et l'identification de *Legionella* sont similaires à ceux décrit pour les échantillons d'eau (§ 6.2).

6.4 Denombrement Total des Bacteries apres marquage au DAPI

6.4.1 Dénombrement des bactéries totales

Le dénombrement des bactéries après marquage par un fluorochrome marqueur de l'ADN, le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) permet d'apprécier la totalité de la population bactérienne, vivante et morte indépendamment de son état physiologique ou d'une cible bactérienne spécifique. Le principe de ce marquage bactérien réside dans la complexation d'une molécule de DAPI au niveau de trois paires de bases A-T de l'ADN ciblé. Ce complexe émet une fluorescence bleue lorsqu'il est excité par une lumière U.V. : après marquage, les bactéries sont visualisées en bleu. Cette méthode de détection est basée sur le protocole décrit par Saby *et al.* [1997] sur des échantillons d'eau.

Dans la pratique, les échantillons liquides (eau ou aérosol) sont filtrés sur une membrane noire en polycarbonate de 0,2 µm de porosité et 25 mm de diamètre. Après 15 minutes de marquage avec une solution de DAPI (3 µg.mL^{-1}) à température ambiante, la membrane est rincée deux fois avec 10 mL

d'EDSA, puis montée entre lame et lamelle avec une goutte de citifluor ; la lecture est réalisée avec un objectif à l'immersion (100x) par microscopie en épifluorescence sous lumière U.V. ($\lambda_{excitation}$ = 345 nm ; $\lambda_{émission}$ = 465 nm). Le microscope à épifluorescence (Olympus, BX41) est équipé du cube U-MNU2 spécifique à la détection du DAPI (Olympus, U-MNU2). Les bactéries marquées de 30 champs microscopiques choisis au hasard sur le filtre sont comptées pour chaque échantillon.
Le nombre total de cellules dans l'échantillon, C_{total}, est déterminé par l'équation 2.1 :

$$C_{total} = \left(\frac{N}{V}\right) \times \left(\frac{F}{A}\right) \qquad (2.1)$$

où N est le nombre moyen de cellules comptées pour chaque champ microscopique, V est le volume de filtration (mL), F est la surface de filtration (2,84 cm^2) et A est la surface d'un champ microscopique ($7{,}0.10^{-5}$ cm^2).

Dans nos conditions expérimentales, la limite de détection est de 6,7 x 10^4 cellules.L^{-1} pour 20 mL d'échantillon analysé.

6.5 Denombrement de *Legionella* par Hybridation in situ (FISH)

6.5.1 Solutions pour l'hybridation *in situ*

6.5.1.1 Solutions de sondes oligonucleotidiques

Les amorces utilisées pour détecter *Legionella spp.* sont les sondes LEG705, LEG226 et LEGPNE1 (Eurogentec) spécifiques du genre *Legionella* [Buchbinder *et al.*, 2002 ; Amann *et al.*, 1995 ; Manz *et al.*, 1995]. Elles sont marquées en 5' par un fluorochrome : le Cy3 (carbocyanine). Les séquences oligonucléotidiques des trois sondes sont les suivantes :
LEG705 : 5'-CTGGTGTTCCTTCCGATC-3'
LEG226 : 5'-TCGGACGCAGGCTAATCT-3'
LEGPNE1 : 5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3'

Chaque sonde est fournie sous forme lyophilisée. Elle est reprise au laboratoire dans du tampon Tris-EDTA à pH 8 stérile (Sigma, T-9285) et répartie en microtubes stériles à raison de 50µL. Les tubes sont stockés à -20°C. Au moment de l'utilisation, après décongélation à température ambiante (20-25°C), la solution de sonde est diluée avec la solution d'hybridation jusqu'à obtenir la concentration voulue (1ng.μL^{-1} de chaque sonde).

6.5.1.2 Solutions d'hybridation et de lavage

La solution d'hybridation est composée de 20% de formamide (Sigma, F-9037), 0,9 M de NaCl (Sigma, S-9625), 0,1% de SDS (Sigma, L-4522) et 20 mM de Tris-HCl pH 7,2 (Sigma, T-2538).
La solution de lavage comprend 215 mM de NaCL, 0,1% de SDS et 20 mM de Tris-HCl à pH 7,2.

6.5.2 Dénombrement de *Legionella* par hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique d'appréciation de la composition taxonomique d'environnements qui permet de repérer spécifiquement à l'aide de sondes oligonucléotiques s'appariant avec les ARN ribosomaux, les bactéries recherchées, ici les légionelles.
L'hybridation *in situ* est basée sur le protocole décrit par Manz *et al.* [1995] sur des échantillons d'eau améliorée par la technique de double marquage au DAPI (4'-6-diamidino-2-phényl-indole) développée par Declerck *et al.* [2003].
La détection de légionelles par la technique FISH est réalisée à la fois sur les échantillons d'eau et d'aérosols.

La technique d'hybridation *in situ* s'effectue en 5 étapes principales :
❶ Concentration par filtration de l'échantillon sur membrane blanche en polycarbonate de 25 mm de diamètre et 0,2 µm de diamètre de pore (Millipore, GTTP02500).

❷ Fixation des entités bactériennes par ajout de formaldéhyde à 3,7% directement sur le filtre. Après un temps de contact de 30 minutes à température ambiante, la membrane est rincée, séchée à 37°C, déshydratée à l'éthanol 50, 80 et 95% (3 minutes chaque bain) puis séchée à l'étuve à 37°C. La fixation conduit à la réticulation des macromolécules ce qui a pour effet de les stabiliser de figer leur structure et la composition de la bactérie. La fixation permet aussi la pénétration des sondes oligonucléotidiques.

❸ L'hybridation qui consiste à ajouter les sondes oligonucléotidiques en excès et à contrôler la température et la composition du milieu d'hybridation (stringence) afin de favoriser l'appariement de la sonde à l'ARN ribosomal de la bactérie ciblée. Dans la pratique, 10 µL de la solution d'hybridation sans sonde et 50 µL de la solution d'hybridation + sonde (1 $ng.\mu L^{-1}$ de chaque sonde) sont déposées sur la membrane. L'hybridation a lieu en chambre humide (saturée avec du NaCl 0,9M) à 46°C pendant 2 heures, à l'obscurité. La membrane est ensuite rincée par 2 trempages successifs dans 30 mL de solution de lavage préchauffée à 46°C±1°C pendant 30 minutes chacun.

❹ Un double marquage avec le fluorochrome DAPI (3 $\mu g.mL^{-1}$) est réalisé en mettant en contact pendant 15 minutes la membrane avec le fluorochrome à température ambiante. Puis, la membrane est rincée deux fois avec environ 2 mL d'EDSA. Cette étape permet de valider que les entités fluorescentes en FISH correspondent bien à des bactéries dont les acides nucléiques fluorescent en marquage DAPI.

❺ La lecture s'effectue, après montage de la membrane entre lame et lamelle avec une goutte de citifluor (Biovalley, 19476-A), en microscopie par épifluorescence (Olympus, BX41) à l'immersion avec une excitation sous lumière verte (550 nm) et une émission de fluorescence rouge (568 nm) (cube Olympus, U-MWG2).

La lecture au microscope des légionelles hybridées s'effectue comme décrit pour le marquage DAPI et leur quantification est déterminée selon l'équation 2.1. Dans nos conditions d'essais, la limite de détection est de $3.10^2.L^{-1}$ air et $9.10^3.L^{-1}$ eau.

7 ANALYSES BIOLOGIQUES

Les dosages de l'antigène urinaire anti-*Legionella* SG.1 et de titres en anticorps anti-*Legionella* ont été réalisés par le Centre National de Référence des légionelles (CNRL) de Lyon, dans le cadre d'une collaboration. Rappelons ces dosages sont réalisées sur les échantillons biologiques, au terme du suivi de 4 mois, par chacun des volontaires.

Les modalités de transport des échantillons, préconisées par le CNRL, ont été définies de manière à garantir leur stabilité. Les urines sont recueillies dans un pot de prélèvement et conservées à une température de 4°C jusqu'à analyse. Le sang est prélevé dans un tube à hémolyse contenant un anticoagulant, centrifugé le jour même du prélèvement afin de recueillir que le sérum qui sera conservé dans les mêmes conditions que les urines. L'ensemble de ces prélèvements biologiques ainsi que leur traitement et envoi a été réalisé par les infirmières de recherches cliniques du Centre d'Investigation Clinique de Nancy (CIC-INSERM) partenaire du projet de recherche Légion'AIR.

7.1 Recherche d'Antigenes Urinaires

Les antigènes solubles de *L. pneumophila SG.1* dans les urines sont concentrés par ultrafiltration sélective et sont ensuite détectés grâce à un kit unitaire d'immunochromatographie sur membrane, le NOW® (Oxoïd). La sensibilité est de 80% et la spécificité de la technique est de 99%. La valeur prédictive positive (VPP) est de 86% et la valeur prédictive négative (VPN) de 95% [Freney *et al.*, 2000].

7.2 Dosage des Titres en Anticorps anti-*Legionella*

Les anticorps circulants contre *Legionella* sont détectés dans le sérum par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI). Le CNRL utilise des antigènes préparés dans leur laboratoire. Des embryons de poulet de 6 à 7 jours sont inoculés par voie vitelline ; 5 jours plus tard les sacs vitellins sont recueillis, broyés, lavés et dilués de façon à obtenir environ 50 bacilles par champ. L'antigène est inactivé par le formol à 2,5 %. Des antigènes monovalents et polyvalents de l'ensemble des sérogroupes et des espèces de *Legionella* sont ainsi préparés.

Les différentes immunoglobulines (IgM, IgA et IgG) sont détectées par la technique IFI. La sensibilité et la spécificité de la technique IFI sont seulement disponibles pour un titre élevé et sont de : sensibilité faible (10 %) avec une VPP extrêmement basse (15%) ; spécificité de 94% avec une VPN de 91% [Freney *et al.*, 2000].

Il est important de rappeler que dans notre étude, les anticorps sont considérés comme des marqueurs biologiques d'exposition sans pour autant apporter la preuve de l'origine et du moment de l'exposition. D'ailleurs, nous ne disposons pas du statut initial des personnes âgées au début de l'étude, et nous travaillons sur un sérum unique, il nous est donc impossible d'observer une séroconversion et de conclure à une infection réelle.

Dix huit dosages des titres en anticorps ont été réalisés sur chaque prélèvement sanguin. Ils sont dirigés contre les espèces suivantes :

- *L. pneumophila* SGs. 1 à 10 et
- *L. micdadei, L. bozemanii, L. dumoffii, L. jordanis, L. gormanii, L. longbeachae SGs 1* et *2, L. anisa.*

Les limites de détection des titres en anticorps anti-*Legionella* sont le titre 1/16 pour les espèces de *L. pneumophila* SG.1 à 6 et le titre 1/64 pour les autres espèces recherchées.

8 ANALYSES STATISTIQUES

Les données épidémiologiques ont été saisies avec le logiciel Epi info 3.3. Elles ont ensuite été vérifiées et condensées en une seule table grâce au logiciel FoxPro, logiciel de gestion de fichiers en langage MS-DOS. Les données environnementales ont été saisies sur le tableur Excel et le logiciel StatView 5.0. (SAS Institute Inc., Cary, NC).

8.1 TESTS STATISTIQUES

Des tests du χ^2 ont été réalisés : d'une part d'homogénéité (test bilatéral) afin de déterminer le lien entre les antécédents, les anticorps et la fièvre de Pontiac ; d'autre part de densité d'incidence (test unilatéral) afin de définir le lien existant entre les différentes concentrations en *Legionella* dans l'eau et dans l'air et la fièvre de Pontiac.

Dans certains cas des tests exacts de Fisher ont été effectués en cas d'effectifs faibles.

La distribution des variables (concentrations en *Legionella* cultivables, bactéries totales, *Legionella* hybridées) n'étant pas gaussienne, des tests non paramétriques ont été utilisés, comme le coefficient de corrélation de Spearman, le test U de Mann-Whitney, le test de Kruskall-Wallis et le test des signes appariés à partir des logiciels Excel et StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

8.2 ANALYSES QUALITATIVES

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée grâce aux logiciels Statgraphics Plus (5.1) et Uniwin Plus (5.2) pour apprécier les relations entre les teneurs en *Legionella* dans l'eau et dans l'air en fonction des données physiques environnementales.

L'ACP est une analyse factorielle qui permet de visualiser sur des plans successifs à 2 dimensions, les nuages de points situés dans un espace à p dimensions. Les axes dits factoriels, constituant ce plan, permettent de disposer de la distance entre les variables.

Dans la pratique, les données sont préalablement centrées et réduites afin de rendre l'interprétation indépendante des unités de mesure choisies.
L'analyse en composante principale permet de décrire la proximité entre les variables (concentrations de *Legionella* dans l'eau, facteurs physiques ambiants) et leur influence sur les concentrations en *Legionella* de l'aérosol au même point de douche.

8.3 Analyses Quantitatives

Les analyses statistiques quantitatives utilisées dans cette analyse sont les régressions logistiques (bivariées ou multivariées). Ces analyses multivariées permettent d'identifier des facteurs de risque, et de disposer d'une équation mathématique visant à « prédire » le risque (présence de *Legionella* ; fièvre de Pontiac) en fonction de la présence de ces facteurs de risque.

Lors de l'établissement d'un modèle mathématique entre les teneurs en *Legionella* et les caractéristiques des réseaux d'eau, une régression logistique par la méthode dite « pas à pas » a été utilisée pour l'analyse multivariée. La variable dépendante binaire est la présence/absence de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude des maisons de retraite. Les variables prédictives sont la température de l'eau chaude au niveau des points d'usage et les quatre catégories de paramètres monitorés lors du diagnostic réseau potentiellement facteurs de risque à la colonisation de *Legionella*. La probabilité seuil pour entrer enlever un paramètre était fixée à 0,10.

Lors de l'analyse des facteurs de risque de la fièvre de Pontiac, la variable dépendante binaire est le statut cas/non cas de fièvre de Pontiac. Les variables explicatives sont les antécédents médicaux et/ou les teneurs en *Legionella* dans l'eau ou dans l'air.

Ces analyses ont été réalisées grâce aux logiciels SAS et Stata 7 (Stata Corporation, USA).

3

QUALITE DES RESEAUX D'EAU ET CONTAMINATION EN LEGIONELLES DES MAISONS DE RETRAITE

Sommaire

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 97
2 PROTOCOLES 98
2.1 SITES DE PRELEVEMENTS 98
2.2 CARACTERISATION DU RESEAU D'EAU PAR LE DIAGNOSTIC RESEAU 99
2.2.1 Réalisation du diagnostic réseau 99
2.2.2 Criticité des réseaux d'eau à la contamination par *Legionella* 100
2.3 METHODES DE PRELEVEMENT 100
2.3.1 Détermination des points de prélèvements 100
2.3.2 Conditions de prélèvement de l'eau chaude de douche 101
2.3.3 Démarche expérimentale de l'appréciation de l'évolution temporelle des *Legionella* 101
3 RESULTATS 102
3.1 CRITICITE DES RESEAUX D'EAU CHAUDE SANITAIRE 102
3.2 CONTAMINATION DE L'EAU PAR *LEGIONELLA* 104
3.2.1 Qualité microbiologique des eaux chaudes 104
3.2.2 Comparaison des niveaux en légionelles dans l'eau chaude de 1er jet et purge 105
3.2.3 Evolution temporelle des concentrations en *Legionella* 107
3.3 RELATIONS ENTRE DIAGNOSTIC RESEAU ET PRESENCE DE *LEGIONELLA* 110
4 DISCUSSION 133
4.1 QUANTIFICATION DE *LEGIONELLA* DANS LES EAUX CHAUDES SANITAIRES 133
4.2 RELATIONS ENTRE DIAGNOSTIC RESEAU ET PRESENCE DE *LEGIONELLA* 133

L'objectif de ce chapitre est de déterminer l'occurrence de *Legionella spp.* dans les eaux chaudes, prélevées aux points de douche d'une trentaine de maisons de retraite de la région Lorraine.

Cette cartographie de contamination des réseaux d'eau chaude par *Legionella spp.* a été mise en relation avec les résultats d'une analyse des points critiques répertoriés sur chaque réseau d'eau de ces établissements, afin de disposer d'un modèle prédictif de contamination des eaux chaudes sanitaires aux points d'usage à partir des données d'un diagnostic réseau.

1 CONTEXTE DE L'ETUDE

L'évolution croissante des épidémies de légionellose [Joseph, 2004] a contraint les ministères publics, français et européens, d'éditer des normes directives [DGS 2005 ; DGS 2002] afin de guider les particuliers et professionnels au problème de la colonisation des réseaux d'eau par *Legionella*, bactérie pathogène ubiquiste des environnements hydriques, naturels et artificiels [Fields *et al.*, 2002 ; Steinert *et al.*, 2002 ; Winn, 1988 ; Ciesielski *et al.*, 1984 ; Fliermans *et al.*, 1981].

Ce germe pathogène est réputé pour coloniser les installations en contact de l'eau, comme les réseaux d'eau chaude sanitaire, où les températures sont comprises entre 25 et 63°C, températures de survie et de croissance optimums pour *Legionella*. De nombreuses études illustrent la colonisation des réseaux d'eau chaude par les légionelles. Elles sont retrouvées aussi bien dans les réseaux d'eau des établissements de santé [Leoni *et al.*, 2005 ; Perola *et al.*, 2005 ; Alary et Joly, 1992] que des établissements communautaires (hôtel, immeuble) [Borella *et al.*, 2005 ; Leoni *et al.*, 2005].

Le rôle de plusieurs éléments, influençant la présence de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude sanitaire, ont été décrits dans la littérature. Entre autres, la température de l'eau [Wadowsky *et al.*, 1985], les matériaux de canalisations [Van der Kooij *et al.*, 2005 : Rogers *et al.*, 1994] et les caractéristiques physico-chimiques de l'eau [Borella *et al.*, 2005]. S'il existe des directives décrivant les points critiques contribuant à une contamination en légionelles des réseaux [DGS, 2002 ; Standards Australia, 1998 ; EPA, 1999], des relations multiparamétriques et quantitatives entre [caractéristiques du réseau] - [*Legionella*] dans un réseau réel sont quasi inexistantes.

Ainsi, il est apparu intéressant de tenter, d'une part de relier les spécificités propres des réseaux d'eau à la présence de *Legionella spp.* et *L. pneumophila*, et d'autre part de prédire la présence de ce germe pathogène au sein des réseaux sanitaires. Ces relations ont été effectuées en regroupant les résultats obtenus sur les réseaux d'eau sanitaire d'une trentaine de maisons de retraite de la région lorraine.
A cet égard, l'analyse technique des réseaux d'eau a été réalisée afin de pouvoir disposer des éléments caractéristiques de chaque réseau ; elle est nommée par mesure de simplicité, diagnostic réseau. Les campagnes de prélèvement de l'eau se sont déroulées entre octobre 2003 et novembre 2005 à raison de deux campagnes dans chacune des structures de santé et au niveau de plusieurs points d'usage représentatifs de l'utilisation des douches par les patients. Elles ont servi à la recherche de *Legionella*, à la fois par la méthode normative de culture et par la méthode d'hybridation *in situ*.

Ce chapitre s'organise en trois parties : d'une part, les protocoles employés sont présentés. Dans un deuxième temps, sont présentés les résultats qui permettent à la fois de disposer de données sur les réseaux d'eau, de données globales de contamination en *Legionella spp.* des eaux chaudes des maisons de retraite, mais aussi de modèle prédictif explicatif de la présence de *Legionella spp.* en fonction des éléments du réseau d'eau. Enfin, dans un troisième temps, une discussion générale des résultats est présentée.

2 PROTOCOLES

2.1 SITES DE PRELEVEMENTS

La répartition de l'ensemble des sites de prélèvements (maisons de retraite) concernés par l'étude est traduite sur la carte jointe (Figure 3.1). Ces sites de prélèvements ont été identifiés par leur numéro de département suivi de leur numéro d'ordre chronologique.

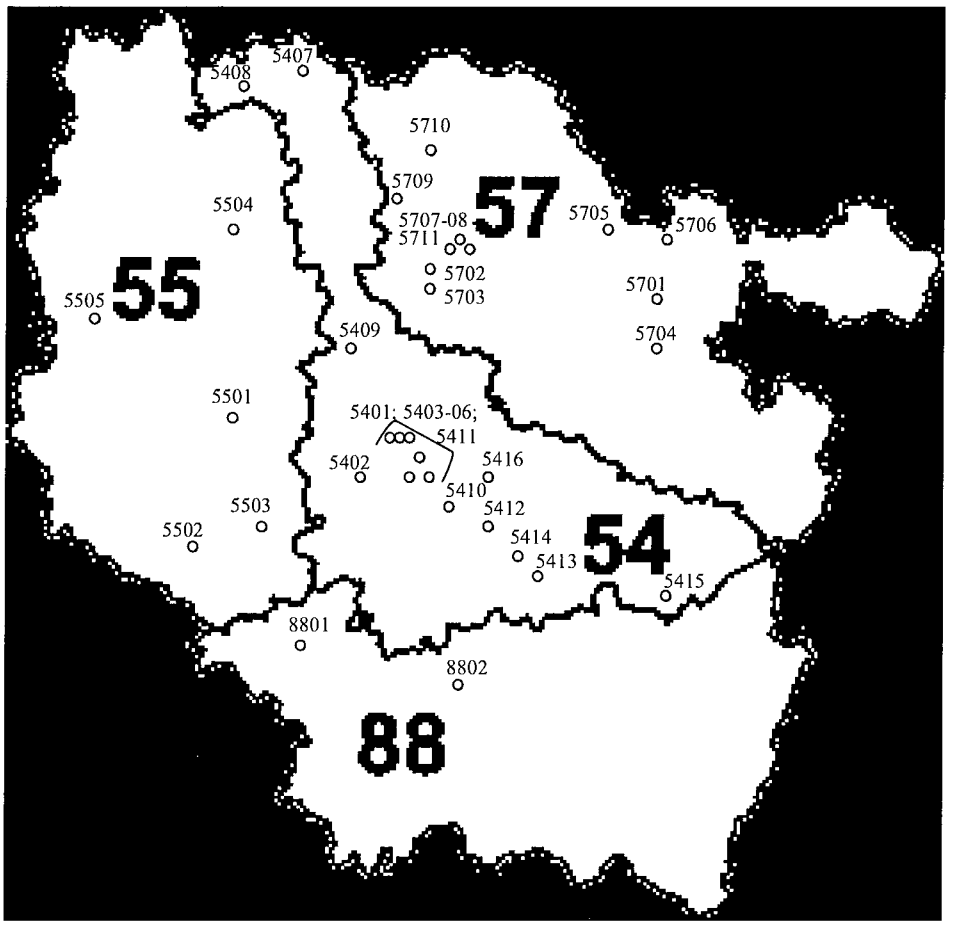


Figure 3. 1 : Cartographie des sites de prélèvements dans la région lorraine.

2.2 CARACTERISATION DU RESEAU D'EAU PAR LE DIAGNOSTIC RESEAU

Au sein de chaque maison de retraite, la réalisation d'un diagnostic réseau d'eau, par un professionnel, permet de caractériser le réseau d'eau en terme de maîtrise du risque légionelles. Il est effectué selon un protocole Ofis (filiale de Véolia, partenaire de ce projet) et suit les directives du ministère de la santé [DGS, 2002].

2.2.1 Réalisation du diagnostic réseau

La réalisation d'un diagnostic réseau d'eau chaude par un professionnel passe par les étapes suivantes :

- Etude des systèmes de production et de distribution d'eau, c'est-à-dire des canalisations, des accessoires et des équipements, d'un point de vue de la conception, de la mise en œuvre, de l'exploitation et de l'entretien,
- Examen des procédures de maintenance,

- Recherche, identification et caractérisation des éléments critiques : ensemble des paramètres pouvant avoir une influence sur les risques de contaminations tels que la présence de bas morts, … tels que définit par les textes réglementaires (chapitre 2, §3.3).
- Mesures sur sites de températures et pH,
- Définition des actions à mener : à court terme et à moyen terme, en terme de modifications du réseau et de maintenance,

Ces différentes étapes du diagnostic sont décrites et définies plus précisément dans le chapitre 2 « matériel et méthodes ».

2.2.2 Criticité des réseaux d'eau à la contamination par *Legionella*

Une fois le diagnostic réalisé, les points critiques sont clairement identifiés. Il est alors possible d'évaluer la maîtrise du risque sur quatre postes :

- Alimentation en eau froide de la production d'eau chaude sanitaire (REF),
- Production d'eau chaude sanitaire (Prod),
- Réseaux de distribution de l'eau chaude (ECS),
- Points d'usage (PtUsa).

En fonction de la présence ou l'absence de points critiques relevés sur le terrain et des opérations de maintenance, un score de criticité (définie par le calcul d'un algorithme spécialement développé par la société Ofis) est attribué à chacun des postes cités précédemment. A chaque score correspond un niveau de maîtrise du risque légionelles :

- 1 : maîtrise du risque légionelles sous contrôle,
- 2 : mise sous contrôle du risque légionelles insuffisante,
- 3 : mise sous contrôle du risque légionelles déficiente,
- 4 : absence totale de contrôle du risque légionelles.

2.3 Methodes de Prelevement

2.3.1 Détermination des points de prélèvements

La contamination du réseau est reliée à la caractérisation de l'exposition des personnes âgées aux légionelles d'aérosols d'eaux chaudes en établissements collectifs. La détermination des points de prélèvements est réalisée à l'aide d'un protocole défini. Il est bien entendu impossible financièrement et techniquement d'échantillonner chaque point d'eau relié à chaque volontaire au sein des divers établissements.

La détermination des points de prélèvements se fait en plusieurs étapes :

1. Caractérisation et organisation générale du réseau d'eau dans l'ensemble de l'établissement,
2. Localisation des volontaires à l'étude et de leur point de douche,
3. Application des règles de décision en fonction de la configuration du réseau afin de relier chaque volontaire à son propre point d'usage ou le cas échéant à un point d'usage représentatif de son exposition. Les règles de décision pour la détermination des points de prélèvements sont fonction de la configuration du réseau et peuvent être séparées en quatre groupes (chapitre 2),
4. Détermination des points de prélèvements caractéristiques de l'exposition des volontaires au projet.

2.3.2 Conditions de prélèvement de l'eau chaude de douche

Comme décrit dans le matériel et méthodes, un premier prélèvement d'eau est effectué dès la mise en fonctionnement de la douche et correspond au « 1er jet ».

Après 7 minutes d'écoulement de la douche, un deuxième prélèvement d'eau dit « purge » est réalisé.

La mesure de la température et du pH de l'eau est réalisée à l'aide du pHmètre 330i (WTW) directement placé sous le jet d'eau, tout au long de la durée de la douche.

Un duplicat de ces prélèvements d'eau a été réalisé à deux jours d'intervalle au même point de douche et dans les mêmes conditions que spécifié ci-dessus.

La détection des légionelles dans ces prélèvements environnementaux a été effectuée par la méthode de référence, la culture sur gélose et par une nouvelle approche, l'hybridation *in situ* (FISH). Ces prélèvements d'eau ont été réalisés dans 34 établissements de santé (chapitre 2, §6).

2.3.3 Démarche expérimentale de l'appréciation de l'évolution temporelle des concentrations en *Legionella*

Le suivi dans le temps (sur 5 à 18 jours) des concentrations en *Legionella spp.* et *L. pneumophila* a pour but d'apprécier les variations de concentrations en légionelles (hybridées et cultivables) et en bactéries totales dans l'eau chaude de douche. Pour répondre à cet objectif, deux maisons de retraite (MR) volontaires ont été sélectionnées ; dans chacune, trois points de douche ont été échantillonnées régulièrement (deux à quatre fois par jour), selon les conditions spécifiées ci avant (§1.3.2), sur une période de 5 jours pour l'établissement MR1 et de 18 jours pour MR2.

La maison de retraite MR1 a été choisie pour sa bonne gestion du risque de présence de légionelles avec la mise en place de la réglementation française [DGS, 2002]. La maison de retraite MR2 a été choisie en raison de déficiences au niveau de la maintenance aux points d'usage et pour la présence d'un mitigeur au niveau de la production d'eau chaude, facteur de risque de la présence de légionelles.

Le réseau de distribution de MR2 est de ce fait contaminé par *Legionella* de manière continue, malgré des mesures de prévention mises en places : chloration continue ; choc thermique quatre mois avant notre étude.

Les trois points de douche, situées dans les chambres des patients, ont été choisis selon leur localisation sur le réseau d'eau :

- A : près de la production d'eau chaude,
- B : à une distance intermédiaire entre les points A et C ;
- C : éloignée de la production d'eau chaude.

Sur chacun de ces échantillons d'eau, les légionelles sont détectées par culture et par hybridation *in situ* ainsi que les bactéries totales par marquage DAPI (chapitre 2, §6).

3 RESULTATS

Les paragraphes suivants développent successivement (i) les résultats de criticité des réseaux d'eau des établissements, (ii) les résultats de contamination en *Legionella spp.* pour les deux échantillons d'eau prélévés (1er jet et purge), (iii) l'évolution temporelle de la contamination des eaux chaudes d'une maison de retraite et (iv) la relation entre les points critiques observés par le diagnostic réseau et la contamination en *Legionella spp.*. Ce dernier point est présenté sous la forme d'une publication pour soumission à la revue Water Research.

3.1 CRITICITE DES RESEAUX D'EAU CHAUDE SANITAIRE

L'analyse des réseaux d'eau chaude et la détermination des points critiques lors du diagnostic ont permis de caractériser le réseau d'eau en terme de maîtrise du risque légionelles, divisé en quatre postes analysés de manière indépendante. Pour chacun de ces postes, les scores de maîtrise du risque varient de 1 à 4 selon un gradient croissant de criticité (Figure 3.2).

Aucune des 34 maisons de retraite ne présente pour les quatre postes du réseau, soit une maîtrise de risque sous contrôle (score 1) soit une absence totale de maîtrise du risque (score 4).
Les sites étudiés présentent pour les trois quarts des « insuffisances (score 2)» et des « déficiences (score 3) » au niveau de la maîtrise du risque légionelles, tous postes confondus. Il s'est avéré que l'absence totale (score 4) de maîtrise du risque légionelles a été identifiée seulement pour une seule composante du réseau (Point d'usage) et ce pour un seul site.

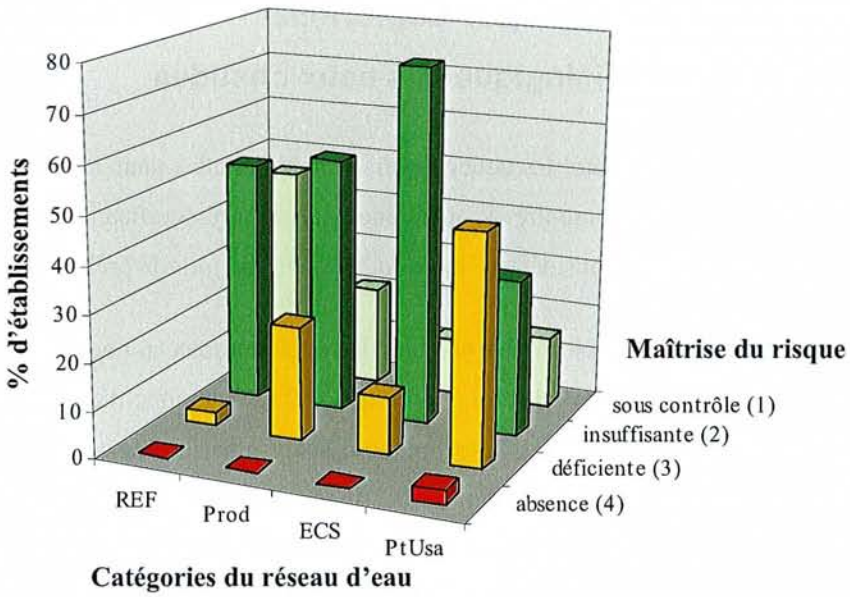


Figure 3. 2 : Criticité des réseaux d'eau des 34 maisons de retraite de Lorraine établi sur la base du diagnostic réseau.

Les points critiques les plus fréquemment rencontrés qui expliquent les scores de criticité et le plus souvent une mauvaise maîtrise du risque légionelles sont, suivant la composante du réseau :

- Pour l'alimentation en eau froide de la production d'eau chaude sanitaire : des bras morts (sans point d'usage à l'extrémité) concernant 52% des établissements.
- Pour la production d'eau chaude sanitaire : d'une part les traitements de l'eau avec une absence totale de vérification des quantités de produits consommés (quantité de sel dans l'adoucisseur, chlore, …) et de leurs réglages soit une absence totale de nettoyage et de désinfection des différents éléments composant le ou les traitements de l'eau ; et d'autre part, liée à la température en sortie du système de production qui était pour 47% des sites <60°C.
- Pour le réseaux de distribution de l'eau chaude : la présence de bras morts (65% des sites) sur le réseau général, l'absence d'un calorifugeage (isolation thermique) intégral du réseau d'eau chaude sanitaire.
- Pour les points d'usage : d'une part la présence de tuyaux borgnes et l'absence de maintenance et de désinfection laissant s'installer dépôts et tartre et d'autre part la température mesurée <50°C (dans 50% des sites) contrairement aux directives de la réglementation française.

3.2 Contamination de l'Eau par Legionella

3.2.1 Qualité microbiologique des eaux chaudes

Le test des signes appariés réalisé entre les concentrations de légionelles dans l'eau mesurées sur les deux jours de prélèvement n'a pas montré de différence statistique significative. Dans la suite du manuscrit, toutes les valeurs seront considérées, indépendamment du jour de prélèvement.

La majorité des échantillons d'eau présente des niveaux de concentrations en *Legionella* inférieurs aux limites de détection des méthodologies utilisées, quelle que soit la technique d'analyse (Tableau 3.1). Concernant les échantillons d'eau de 1er jet, la technique d'analyse par biologie moléculaire (FISH) a permis la détection de légionelles (dont le nombre de ribosomes était suffisant pour être visualisé) dans 55% des eaux chaudes avec une concentration maximale atteignant 1,6 x 10^8 *Legionella*-FISH.L^{-1}. Parmi cette population, les légionelles cultivables sont détectées dans près d'un quart des échantillons d'eau de 1er jet.

Les échantillons d'eau de purge sont tout aussi contaminés par les légionelles hybridées et cultivables, dans respectivement 48,5 et 24,6% des cas. Tous les détails spécifiques aux concentrations des eaux de purge sont présentés dans l'article « *Legionella* dans les Réseaux d'Eau Chaude des Maisons de Retraite Françaises : Prévalence et Facteurs Prédisposants » (§3.3).

Tableau 3. 1 : Caractéristiques microbiologiques moyennes des eaux chaudes de douches de 34 maisons de retraite de Lorraine.

	Bactéries totales (Cellules.L^{-1})	***Legionella spp.* (UFC.L^{-1})**	***L. pneumophila* (UFC.L^{-1})**	***Legionella* hybridées (Cellules.L^{-1})**
Eaux de 1er jet (n=338)				
Echantillons positifs (%)	ND	78/338 (23,1)	54/338 (16,0)	186/338 (55,0)
Moyenne géométrique [a]	ND	6,43 x 10^4	3,88 x 10^4	3,29 x 10^5
Médiane [a]	ND	5,00 x 10^4	3,44 x 10^4	2,39 x 10^5
Concentration minimum [a]	ND	1,50 x 10^3	1,50 x 10^3	9,02 x 10^3
Concentration maximum [a]	ND	2,00 x 10^7	1,28 x 10^7	1,55 x 10^8
Eaux de purge (n= 338)				
Echantillons positifs (%)	338	183/338 (24,6)	65/338 (19,2)	164/338 (48,5)
Moyenne géométrique [a]	5,65 x 10^7	3,91 x 10^3	2,07 x 10^3	1,05 x 10^5
Médiane [a]	7,17 x 10^7	1,40 x 10^3	1,40 x 10^3	9,02 x 10^4
Concentration minimum [a]	4,94 x 10^5	2,00 x 10^2	1,00 x 10^2	9,02 x 10^3
Concentration maximum [a]	1,19 x 10^9	2,30 x 10^6	2,47 x 10^5	7,28 x 10^6

[a] calcul réalisé sur les échantillons positifs ; ND = non déterminé

En France, deux niveaux de contamination pour l'eau en *L. pneumophila* cultivables sont définis [CSHPF, 2005] :

- Niveau à atteindre <10^3 UFC.L^{-1} : 17,6% des échantillons d'eau (1er jet et purge) présentent des *L. pneumophila* cultivables et se situent en deçà de 10^3 UFC.L^{-1} ;

• Niveau d'action $\geq 10^3$ UFC.L^{-1} : 13,6% des échantillons d'eau (1er jet et purge) ont atteint ce niveau et 9,5% des présentent une concentration $\geq 10^4$ UFC.L^{-1}.

Les classes de concentration en légionelles de l'eau (Figure 3.3) montre que près de 20% des cas (1er jet ou purge), la concentration en légionelles cultivables au point d'usage est égale ou supérieure au niveau de 10^3 UFC.L^{-1} d'eau. Et, plus de 70% de ces prélèvements ont un niveau de légionelles cultivables inférieur à la limite de détection de la méthode ($\leq$100 UFC.L^{-1}).
Pour près de 50 % des échantillons d'eau (1er jet et purge) positifs en cellules hybridées (FISH), la concentration de 10^5 *Legionella*.L^{-1} est atteinte et dépassée.

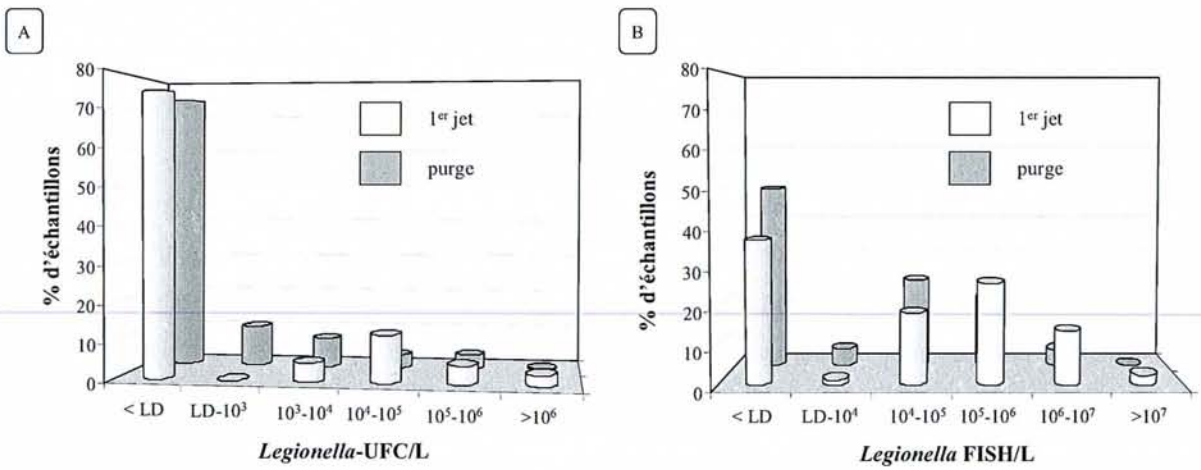


Figure 3. 3 : Classes de contamination des eaux chaudes en Legionella – A : détectées par culture (n=676); B : détectées par hybridation in situ (n=676). (LD = 100 UFC/L ou 9 10³ Legionella FISH/L).

3.2.2 Comparaison des niveaux en légionelles dans l'eau chaude des prélèvements 1er jet et purge

Les deux prélèvements d'eau (1er jet ; purge) avaient notamment pour but de relier la qualité de l'eau du 1er jet avec celle de la purge, en terme de *Legionella*. Le nombre de résultats obtenus au cours de la période d'étude nous permet d'établir des corrélations linéaires.

L'analyse de la figure 3.4 montre qu'il existe une relation significative ($r = 0,62$, $p<10^{-4}$ pour les deux techniques) entre les concentrations de *Legionella* du 1er jet et celles détectées dans les eaux de purge quelle que soit la technique d'analyse. Cependant, d'après cette relation, les variations de quantités de *Legionella* dans les eaux au 1er jet n'expliquent que 36% des niveaux de *Legionella* retrouvées de purge.

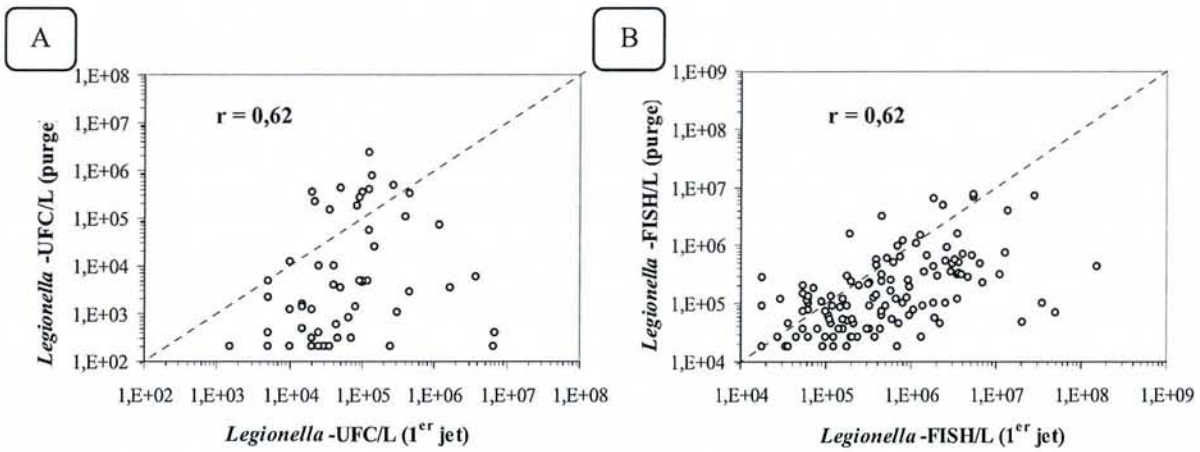


Figure 3. 4 : Concentration de Legionella dans les eaux du 1er jet en fonction de la concentration de Legionella dans les eaux de purge – A : détectées par culture (n=53); B : détectées par hybridation in situ (n=122)

En ce qui concerne la relation entre les niveaux de légionelles des eaux de 1er jet et celles de purge, la figure 3.5 montre, pour tous les points de douche étudiés, que les niveaux de contamination en *Legionella* des eaux du 1er jet sont supérieurs ou égaux (pour 81,1% à 89,9% des points de prélèvements) aux niveaux de contamination des eaux de la purge quelle que soit la technique d'analyse employée. D'ailleurs, toute méthode d'analyse confondue, les concentrations en *Legionella* des deux échantillons d'eau sont significativement différentes (Test Mann-Whitney, p=0.04).

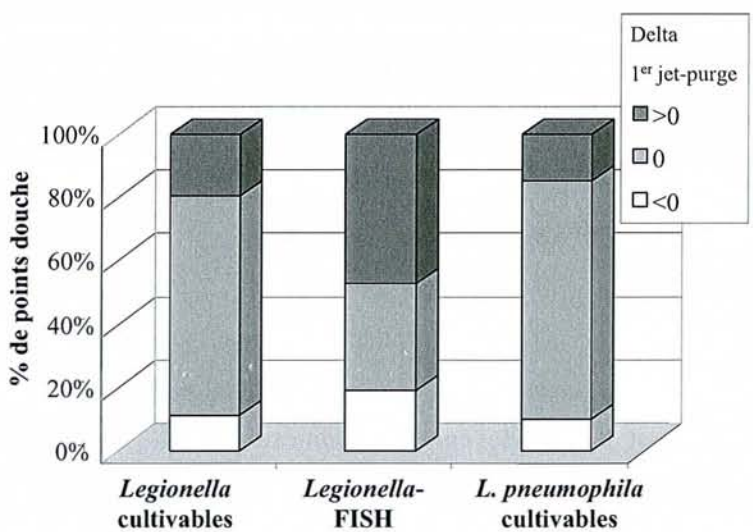


Figure 3. 5 : Fréquence de répartition des delta (différence de concentrations en Legionella) entre les eaux du 1er jet (n=338) et les eaux purge (n=338).

3.2.3 Evolution temporelle des concentrations en *Legionella* des eaux chaudes

Le suivi dans le temps (sur 5 et 18 jours) des concentrations en *Legionella* a pour but d'apprécier les variations de concentrations en légionelles (hybridées et cultivables) et en bactéries totales dans l'eau chaude de trois points de douche (A, B et C) de deux maisons de retraite (MR1 et MR2) choisies pour leur situation très contrastée de la contamination en légionelles de l'eau (§ 2.3.3).

Au niveau de MR1, aucune *Legionella* cultivable et hybridée n'a été détectée au cours des cinq jours de suivi (n=42) quel que soit le point de douche. Ces résultats suggèrent que lorsque un établissement assure une bonne maîtrise du risque légionelles au niveau du réseau d'eau, la contamination semble être contrôlée, en tout cas demeure en deçà de la limite de détection des méthodes utilisées et surtout en deçà du seuil réglementaire de 10^3 UFC.L^{-1}. De ce fait, même si des variations de la contamination en légionelles existent, nos outils analytiques ne nous ont pas permis de les mettre en évidence. Ceci suggère aussi que notre estimation du niveau de contamination au travers d'un seul prélèvement d'eau dans les maisons de retraite peut être dans ce cas de figure considérée comme représentative de la contamination réelle du réseau.

Au niveau de MR2, choisi pour des problèmes récurrents de contamination par *Legionella*, l'évolution temporelle des concentrations en *Legionella* (hybridées et cultivables) ainsi qu'en bactéries totales pour l'eau chaude de trois points de douche montre que (Figure 3.6) :

- Au niveau du point A, situé au plus près de la production d'eau chaude, la température de l'eau chaude est en moyenne de 46,2°C ($\pm$0,5). Les échantillons d'eau chaude (n=21) présentent des concentrations moyennes en bactéries totales de $2{,}0.10^8$ cellules.L^{-1} ($\pm 1{,}2.10^8$). Les concentrations moyennes en *Legionella* hybridées sont de $9{,}6.10^4$ *Legionella*-FISH.L^{-1} ($\pm 7{,}2.10^4$), représentant ainsi 0,05% de la population bactérienne totale. Parmi cette population, *Legionella* cultivable a été détectée en moyenne à hauteur de $2{,}5.10^4$ *L. pneumophila* SG.2-14.L^{-1} ($\pm 2{,}4.10^4$) représentent donc 26% des *Legionella* détectées par FISH.
- Au niveau du point B, point intermédiaire situé entre les points A et C, la concentration moyenne en bactéries totales est de $9{,}2.10^7$ cellules.L^{-1} ($\pm 5{,}6.10^7$) (n=21), parmi lesquelles la population de légionelles représente en moyenne $7{,}4.10^4$ *Legionella*-FISH.L^{-1} ($\pm 6{,}8.10^4$) (0,08% de la population bactérienne totale) et $7{,}2.10^2$ *L. pneumophila* SG.2-14.L^{-1} ($\pm 9{,}6.10^2$) en *Legionella* cultivable (1% des *Legionella* détectées par FISH). La température de l'eau chaude à ce point d'usage est de 52,0°C ($\pm$1,3).

• Au niveau du point C, le plus éloigné de la production d'eau chaude, la température de l'eau chaude est en moyenne de 50,1°C (±1,0).

Les échantillons d'eau chaude (n=21) ont présenté des concentrations moyennes en bactéries totales de $1,1.10^8$ cellules.L^{-1} ($\pm 9,9.10^7$) dont $8,6.10^4$ *Legionella*-FISH.L^{-1} ($\pm 1,1.10^5$) (0,06% de la population bactérienne totale) et $1,0.10^3$ *L. pneumophila* SG.2-14.L^{-1} ($\pm 1,1.10^3$) de *Legionella* cultivable (1,2% des *Legionella* détectées par FISH).

Dans l'eau chaude de douche, quel que soit le point d'usage prélevé (A, B, C), le nombre total de bactéries (marquage DAPI) présente des variations de l'ordre de 1,1 à 2,1 log sur les 18 jours (Figure 3.6). De même, les concentrations en *Legionella* hybridées (FISH) restent relativement stables avec des variations de l'ordre de 1,1 à 1,7 log pour chaque point de douche. Aucune différence significative (Test Kruskall-Wallis, p=0,22) n'a été mise en évidence entre les différents points de douche.

Des *Legionella* cultivables (l'espèce *L. pneumophila* SG.2-14 uniquement) sont régulièrement détectées sans différence significative entre les horaires de prélèvements (Test Kruskall-Wallis, p=0,25). Par contre le point de douche A a présenté systématiquement des concentrations en *L. pneumophila* cultivables significativement supérieures à celles des points de douches B et C (Test Kruskall-Wallis, $p<10^{-4}$) et supérieure aussi au niveau réglementaire de 10^3 UFC.L^{-1} ; le fait que la température de l'eau à ce point d'usage soit bien en dessous de 50°C pourrait être une explication de cette contamination élevée et persistante.

Au niveau des points de douches B et C, aucune différence statistique significative avec les concentrations en *Legionella* cultivables n'a été mise en évidence (Test Mann Whitney, p=0,11). Les concentrations en *Legionella* cultivables, pour ces deux points de douche sont toujours inférieures au seuil réglementaire, à l'exception de quelques points qui dépassent légèrement ce seuil de manière erratique.

En résumé, ces résultats tendent à montrer que pour des concentrations en *Legionella* supérieures à la valeur réglementaire (10^3 UFC.L^{-1}), la contamination de l'eau distribuée présente certes des variations mais elle est systématiquement détectée au point d'usage. Ceci suggère aussi que, dans ce cas de figure, notre estimation du niveau de contamination au travers d'un seul prélèvement d'eau dans les maisons de retraite peut être considérée comme représentative de la contamination du réseau. Dans le cas où les niveaux de contamination avoisinent la valeur réglementaire, les conclusions sont moins nettes, puisque les concentrations peuvent varier de la limite de détection (10^2) à 10^3 UFC.L^{-1}. Dans ce cas de figure, il est probable que nos mesures de la contamination en légionelles puissent être sur- ou sous-estimées de +/- 1 log maximum et dans la limite des 10^3 UFC.L^{-1}.

Figure 3. 6 : Evolution temporelle des concentrations en <u>Legionella</u> et bactéries totales dans les eaux purge de trois points de douche d'une maison de retraite (n=21) – A : près de la production d'eau chaude ; B : sur le réseau d'eau chaude entre les points de douches A et C ; C : le plus éloigné de la production d'eau chaude[1].

[1] Les points manquants sont dus à des problèmes techniques ; Les limites de détection des méthodes sont : 6,7 x 10^4 cellules.L^{-1} (DAPI) ; 1,0 x 10^2 UFC.L^{-1} (culture); 9,0 x 10^3 cellules.L^{-1} (FISH).

3.3 Relations entre Diagnostic Reseau et Presence de *Legionella*

Le diagnostic réseau permet de mettre en exergue les points critiques de chaque réseau d'eau chaude par rapport à un risque de présence de *Legionella*. L'objectif de cette partie est donc d'apprécier le lien existant entre les points critiques définis par le diagnostic réseau et la contamination en *Legionella* dans l'eau chaude au point de douche, afin de déterminer les facteurs prédisposants à une colonisation des réseaux par ce germe pathogène. Cette analyse ne tient compte que des prélèvements d'eau de purge décrits précédemment.

Cette partie est présentée sous le format d'une publication (encore en français) pour soumission à la revue Water Research sous le titre « *Legionella* dans les Réseaux d'Eau Chaude des Maisons de Retraite françaises : Prévalence et Facteurs Prédisposants ».

Legionella dans les Réseaux d'Eau Chaude des Maisons de Retraite Françaises : Prévalence et Facteurs Prédisposants

Deloge-Abarkan M.[1], Oberti S.[2], Dhome N.[1], Zmirou-navier D.[1] et Mathieu L.[3*]

[1] Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré Nancy I, INSERM ERI n°11, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54 505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[2] Anjou-Recherche, Chemin de la Digue, BP76, 78 603 Maisons-Laffitte cedex

[3] Laboratoire d'Hydroclimatologie Santé Environnement, Ecole Pratique des Hautes Etudes, INSERM ERI n°11, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54 505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[*] Corresponding author :

Telephone number : +33 (0)3.83.68.34.86

Fax number : +33(0).83.68.34.89

Email : laurence.mathieu@medecine.uhp-nancy.fr

RESUME

Trente quatre maisons de retraite ont été investiguées pour leur contamination des eaux chaudes sanitaires par *Legionella*. Un diagnostic réseau a été réalisé dans chaque établissement et a permis de mettre en évidence les facteurs de risque à la présence de légionelles dans les quatre composantes du réseau d'eau : réseau général d'eau froide alimentant la production d'eau chaude, production d'eau chaude, réseau général d'eau chaude et points d'usage. Les facteurs de risque identifiés sont codifiés sous la forme de scores de criticité allant de 1 à 4 selon un gradient croissant de risque de présence de *Legionella*. L'objectif de ce travail était de mettre en relation ces scores de criticité avec la présence de *Legionella* dans les réseaux d'eau afin d'analyser le caractère prédictif des scores de criticité en regard de la présence de légionelles au niveau d'un réseau d'eau chaude.

24,6% des eaux chaudes sanitaires des maisons de retraite étaient contaminées par *Legionella* cultivables et 48.5% par *Legionella* détectées par la technique d'hybridation *in situ* (FISH). Des modèles de régression logistique ont été utilisés et ont permis de montrer que la grille des scores de criticité était prédictive de la contamination des eaux chaudes par *Legionella* cultivables aux postes «« *production d'eau chaude* » (O.R. = 26,00 ; [95% I.C.=1,3 à 503,0]), « *réseau de distribution d'eau chaude* » (O.R. = 224,00 ; [95% I.C.=3,9 à 12845,8]) et dans une moindre mesure aux « *points d'usage* » (O.R. = 8,47 ; [95% I.C.=0,8 à 87,4]). Ces résultats sont corroborés lorsque la contamination en légionelles est appréciée par FISH pour le score concernant les « *points d'usage* » (O.R. = 10,80 pour un score ≥ 3 ; [95% I.C. = 1,0 à 116,7]).

En conclusion, cette étude pourrait constituer un outil de base solide à la gestion du risque légionelles avec la mise en évidence de relations fortes entre la présence de légionelles et de points critiques sur les réseaux d'eau.

INTRODUCTION

L'incidence de la légionellose est de 1,0 cas pour 10^6 habitants en Europe, le double pour la France (Campèse *et al.,* 2005), et est en perpétuelle augmentation, notamment en Europe, avec près de quatre fois plus de cas déclarés en dix ans (Joseph *et al.*, 2004). L'âge est connu comme facteur de risque de la maladie du légionnaire (Marston *et al.*, 2004) et la population âgée est la plus susceptible à *Legionella.* Les circonstances d'expositions à risque parmi les cas de légionellose déclarée, sont les hôpitaux, les hôtels, les campings, les stations thermales, et les maisons de retraite (Campèse *et al.*, 2005).

Le biotope aquatique naturel (avec sa diversité) demeure le principal réservoir de la bactérie *Legionella* (Fields *et al.*, 2002 ; Steinert *et al.*, 2002 ; Winn, 1988 ; Ciesielski *et al.*, 1984 ; Fliermans *et al.*, 1981). Néanmoins, *Legionella* est aussi ubiquitaire de systèmes hydriques artificiels (Koneman *et al.*, 1997) dans lesquels, des facteurs favorables à son développement ont déjà été identifiés tels qu'une température d'eau inférieure à 60°C (Lee *et al.*, 1988 ; Vickers *et al.,* 1987 ; Plouffe *et al.,* 1983), l'état des ballons d'accumulation (Alary et Joly, 1992 ; Vickers *et al.,* 1987), ou encore la présence de certains métaux ou matériaux (Rogers *et al.*, 1994 ; Bezanson *et al.*, 1992 ; States *et al.*, 1987). Toutefois, malgré la connaissance de ces facteurs de risque, les réseaux d'eaux chaudes constituent un des réservoirs de *Legionella* dans lesquels il est difficile de l'éradiquer, du fait notamment de la présence d'amibes (Snelling *et al.*, 2006 ; Steinert *et al.*, 1997) ou de biofilm (Murga *et al.*, 2001 ; Rogers *et al.*, 1994) qui joue un rôle protecteur contre les processus de désinfection (Green et Pirrie, 1993 ; Green, 1993).

La culture est la seule méthode réglementaire utilisée pour préjuger de la présence ou non de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires (AFNOR, 2003). Pourtant de nouvelles technologies permettent de répondre au problème aujourd'hui bien connu de la sous-estimation de la population bactérienne par la méthode de culture (Nyström 2001 ; Hussong *et al.*, 1987) et d'identifier la bactérie pathogène beaucoup plus rapidement comme la PCR (Riffard *et al.*, 1996 ; Mahbubani *et al.*, 1990) ou la méthode d'hybridation *in situ* (FISH) (Grimm *et al.,* 1998 ; Manz *et al.*, 1995).

La gestion du risque légionelles n'est pas encore harmonisée au plan international et elle manque de critères précis. Ainsi, le nombre de bactéries *Legionella* motivant des actions correctrices reste discuté. En Allemagne, le niveau d'action est à 10^4 UFC.L^{-1} et en France de 10^3 UFC.L^{-1} ; en Hollande, le seuil est fixé à 10^2 UFC.L^{-1} et aux Etats-Unis, la concentration zéro est visée, sans pour autant établir de seuil maximum (DGS, 2002 ; Bert, 2005 ; EPA, 1999 ; Exner *et al.*, 2002).

Mais la gestion du risque ne peut se fonder uniquement sur une métrologie de routine, car les résultats de la culture sont rétrospectifs (détection après un délai de 10 jours) et très dépendants du choix des points de prélèvement échantillonnés. Afin de palier à ce manque de gestion du risque légionelles, quelques autorités sanitaires nationales (DGS, 2002 ; Standards Australia, 1998 ; EPA, 1999), encore

trop rares, ont donc établi des référentiels afin de prévenir la présence de légionelles à partir du repérage de points critiques sur les réseaux d'eau.

Nous profitons d'un projet de recherche, LEGION'AIR, visant à caractériser l'exposition à *Legionella* des personnes âgées vivant en maisons de retraite dans l'Est de la France, pour procéder à l'étude du pouvoir prédictif d'une grille d'évaluation de la qualité de l'ensemble du réseau d'eau des établissements collectifs. Cette grille, conçue par un grand groupe industriel à partir du référentiel du ministère français de la santé, repose sur l'observation des caractéristiques du réseau d'eau et la détermination des points critiques à *Legionella*. La question posée concerne l'aptitude de cet outil à « prédire » une contamination en légionelles au niveau d'un réseau d'eau chaude. Pour se faire, une première étape de terrain a consisté à (i) caractériser des réseaux d'eau de 34 maisons de retraite du nord-est de la France au travers d'un diagnostic réseau réalisé par un ingénieur spécialiste, afin d'en définir les points critiques et (ii) à évaluer l'occurrence de *Legionella* dans l'eau chaude au niveau de points d'usage de ces établissements, en usant respectivement de la méthode de culture et de la technique d'hybridation *in situ*. Dans un second temps, les données recueillies lors de ces investigations ont été analysées et ont permis de disposer d'un modèle prédictif de la présence de la bactérie pathogène à l'aide des caractéristiques du réseau.

MATERIEL ET METHODES

Situation géographique de l'étude

L'évaluation de la qualité des eaux chaudes a été réalisée dans 34 maisons de retraite (Figure 1) du nord-est de la France. Les structures sélectionnées sont des établissements médicalisés, ayant une capacité d'accueil d'au moins 50 lits et dans la mesure du possible, sont réparties sur la totalité de la région étudiée. Les prélèvements d'eau ont été effectués entre octobre 2003 et novembre 2005. Délibérément, l'historique des contaminations éventuelles en légionelles dans ces établissements n'a pas été vérifié au préalable pour ne pas biaiser les critères de sélection.

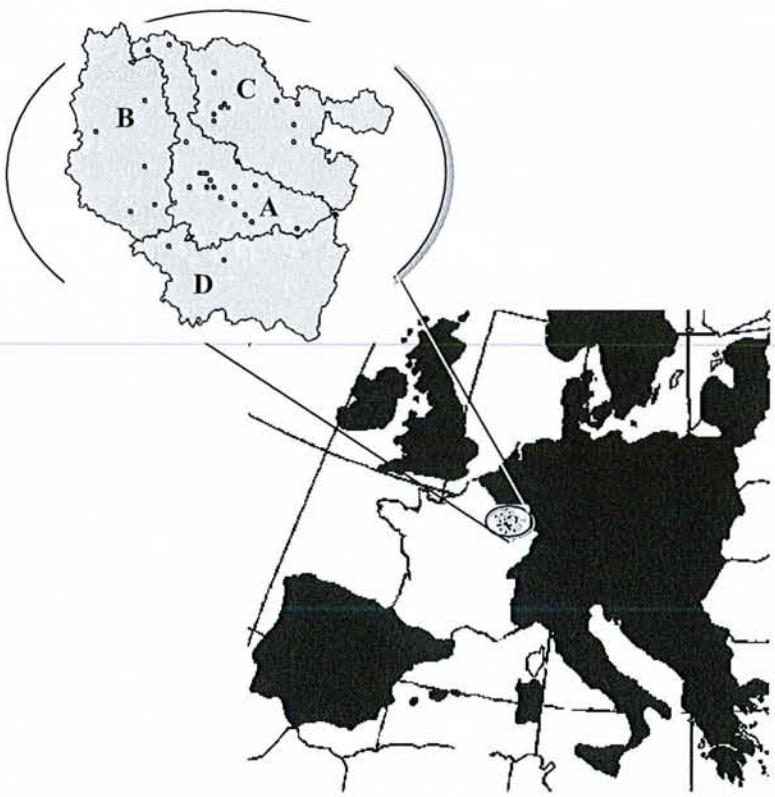


Figure 1. Situation géographique de la Lorraine, une région administrative de la France, composée de quatre départements (A-D) où les 34 maisons de retraite étudiées sont situées - A : 16 ; B : 5 ; C : 11 et D : 2 maisons de retraite.

Réalisation du diagnostic réseau

Les informations sur le réseau d'eau chaude de chaque établissement ont été recueillies par un professionnel selon un protocole défini et identique pour chaque établissement.

Les points observés sur chaque réseau sont regroupés en quatre postes et relèvent respectivement: (i) du Réseau d'eau froide alimentant la production d'eau chaude, (ii) de la Production d'eau chaude, (iii) du Réseau de distribution d'eau chaude et (iv) des Points d'usage.

Pour chacun de ces postes, les points critiques potentiellement révélateur d'une présence de légionelles ont été répertoriés selon les directives des autorités sanitaires françaises (DGS 2005 ; DGS 2002) (Tableau 1).

Tableau 1. Points critiques retenus dans cette étude, représentatifs d'une potentielle contamination par *Legionella* (adapté de la réglementation française, DGS 2002).

Composantes du réseau d'eau	Paramètres observés	Points critiques
Réseau d'eau froide alimentant la production d'eau chaude		
Production d'eau chaude	Bras morts	Présence de bras morts
	Calorifugeage	Non calorifugeage
	Dimensionnement	Sous/sur dimensionnement
	Température de départ	Température de départ < 55°C
	Maintenance	Manque de maintenance (pas de nettoyage, ni désinfection, ni de chasse en point bas du ballon)
	Bras morts	Présence de bras morts
	Traitements d'eau	Pertinence des traitements d'eau
	Mitigeur général	Présence d'un mitigeur général
Réseau de distribution d'eau chaude		
	Matériaux de canalisations	Nature du matériau (métallique, de synthèse)
		Co-existence de deux types de matériaux
	Dégazeur en haut des colonnes	Absence
	Equilibrage du réseau	Mauvais équilibrage du réseau
	Vannes de chasse	Absence/ non réalisation de purge
	Calorifugeage	Non calorifugeage
Points d'usage	Bras morts	Présence de bras morts
	Maintenance des points d'usage	Absence
	Bras morts	Présence de bras morts ou très peu utilisés (< 1/semaine)
	Température	Température < 50°C

Sur la base de ces référentiels, une grille d'analyse systématique de la présence de ces points critiques a été développée par la société Ofis, filiale de Véolia (France).

Pour chacune des 4 composantes, la grille permet de fournir des scores de criticité allant de 1 à 4 selon un risque croissant de contamination du réseau par *Legionella* : un score de 1 correspondant à une maîtrise totale du risque légionelles ; un score de 2 à une insuffisance ; un score de 3 à une déficience ; et un score 4 à une absence totale de maîtrise du risque.
Cet article n'a pas pour objet de valider la construction détaillée de ce logiciel (propriété industrielle) mais, plus globalement, vise à analyser le caractère prédictif des scores de criticité en regard de la présence de légionelles.

Détermination des points de prélèvements d'eau et procédure

Le diagnostic du réseau d'eau chaude des établissements investigués avait aussi pour objectif de sélectionner les points de prélèvements de l'eau au niveau des douches. De un à huit points de douche ont été échantillonnés par maison de retraite (médiane de 5).
Les prélèvements ont été réalisés sur l'eau chaude, le robinet étant ouvert à son maximum de débit et de température. Deux campagnes de prélèvements ont été effectuées à deux jours d'intervalle au même point de douche et dans les mêmes conditions. Pour chacune, un litre d'eau chaude est collecté dans un flacon stérile après 7 minutes d'écoulement. L'échantillon est placé à 4-10°C pendant 24h maximum jusqu'à analyse. La température de l'eau est mesurée tout au long des 7 minutes d'écoulement.

Analyses microbiologiques

(i) Bactéries totales. Le nombre de bactéries totales a été déterminé après marquage par un fluorochrome spécifique de l'ADN, le DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). Il permet d'apprécier la totalité de la population bactérienne, vivante et morte, indépendamment de son état physiologique ou d'une cible bactérienne spécifique. Cette technique de détection est basée sur le protocole décrit par Saby *et al.* (1997). 20 mL d'échantillons d'eau sont filtrés sur une membrane noire en polycarbonate de 0,2 µm de porosité (Millipore GTBP02500) et recouverts par 3 mL d'une solution stérile à 3 µg mL^{-1} de DAPI pendant 15 minutes à température ambiante. Les membranes sont ensuite rincées deux fois avec 10 mL d'eau distillée stérile, séchées, et montées entre lame et lamelle avec une goutte de Citifluor (Biovalley AF87-10). Un microscope à épifluorescence (Olympus, BX41; Zeiss, AXIOSCOP), équipé du cube approprié pour la détection du DAPI (Olympus, U-MNU2), a été utilisé pour dénombrer les bactéries sur la membrane. La lecture a été réalisée à l'immersion (100x). Trente champs microscopiques choisis au hasard sont comptés pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en cellules par litre d'eau et la limite de détection est de 6,7 x 10^4 cellules par litre.

(ii) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Trois sondes oligonucléotidiques (Molecular Probes), LEG705 (5'-CTGGTGTTCCTTCCGATC-3') (Amann *et al.*, 1995 ; Manz *et al.*, 1995 ; Buchbinder *et al.*, 2002), LEG226 (5'-TCGGACGCAGGCTAATCT-3') (Manz *et al.*, 1995) et LEGPNE1 (5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3') (Buchbinder *et al.*, 2002 ; Grimm *et al.*, 1998 ; Hayden *et al.*, 2001), marquées en 5' par la carbocyanine et spécifiques de l'ARN16S de *Legionella*, ont été utilisées. Le protocole FISH est basé sur le protocole décrit par Manz *et al.* (1995). 150 mL d'échantillons d'eau sont filtrés sur membrane blanche en polycarbonate de 0,2 µm de porosité (Millipore GTTP02500). La membrane est ensuite recouverte d'une solution de formaldéhyde à 3,7% pendant 30 minutes, rincée deux fois avec 10 mL de PBS (pH 7,4), séchée et déshydratée à l'éthanol 50, 80 et 95% (3 minutes chaque bain).

Ensuite, 50 µL d'une solution d'hybridation (20% formamide, 900mM NaCl, 0,1% sodium dodecyl sulfate, 20mM Tris-HCl [pH 7.2]), contenant 50 ng de chaque sonde, est déposée sur la membrane. L'hybridation a lieu en chambre humide à 46±1°C pendant 2 heures, à l'obscurité. La membrane est rincée par deux trempages successifs dans une solution de lavage préchauffée à 46°C à pH 7.2 (20 mM Tris HCl, 215 mM NaCl, 0,1% sodium dodecyl sulfate) pendant 30 minutes chacun. Les membranes sont ensuite rincées avec de l'eau distillée stérile préchauffée à 46°C et séchée. Les conditions de comptage microscopique sont les mêmes que spécifiées ci-dessus avec le cube approprié pour la détection de la carbocyanine (Olympus, U-MWG2). Les résultats sont exprimés en cellules par litre et la limite de détection est de 9,0 x 10^3 cellules par litre.

La qualité de la procédure d'hybridation a été vérifiée systématiquement en utilisant des espèces connues pour hybrider (ou non) avec les sondes utilisées spécifiques de *Legionella.*

(iii) Méthode culturale. La détection des *Legionella* cultivables a été adaptée de la norme française AFNOR (AFNOR, 2003), utilisant les milieux de culture GVPC (Glycine, Vancomycine, Polymixine et Cycloheximide) (Oxoïd) et BCYE (Buffer Charcoal Yeast Extract) avec cystéine (Oxoïd). Les colonies de *Legionella* sont comptées après 7 jours d'incubation à 37±1°C. Les résultats sont exprimés en UFC par litre d'eau et la limite de détection est de 1,0 x 10^2 UFC par litre.

(iv) Identification et confirmation des *Legionella cultivables* et des espèces *L. pneumophila*. Après incubation, les colonies suspectes sont comptées, testées pour leur cystéine-dépendance (CD) par repiquage sur les milieux de culture BCYE (Buffer Charcoal Yeast Extract) avec cystéine (Oxoïd) et sans cystéine (Oxoïd) et incubées pendant 48 h à 37°C ±1°C. Les colonies qui se développent à la fois sur les deux milieux de culture sont considérées CD négatives et ne sont donc pas présumées *Legionella*. Les colonies qui se développent uniquement sur le milieu BCYE avec cystéine (colonies CD positives) sont identifiées par agglutination au latex (kit Oxoïd, DR800M) pour permettre la reconnaissance des *L. pneumophila* et *L. species* (Reyrolle *et al.*, 2004).

Analyses statistiques

L'analyse vise à apprécier la relation existant entre le score de criticité de chacune des quatre composantes du réseau d'eau exposées plus haut, et la contamination de l'eau chaude des douches. Pour qualifier de « contaminée » l'eau de douche, le seuil de positivité en *Legionella* a été fixé à 10^2 UFC.L^{-1} pour la méthode culturale (correspondant à la limite de détection de la méthode), et à 10^5 cellules.L^{-1} pour la méthode d'hybridation *in situ*. Les tests du Khi deux de Pearson (Epi Info 6.0) ont été effectués afin de déterminer le lien entre les facteurs géo-temporels et le pourcentage d'échantillons positifs en légionelles. La distribution des variables n'étant pas gaussienne, des tests non paramétriques ont été utilisés, comme le coefficient de corrélation de Spearman, le test U de Mann-Whitney, le test de Kruskall-Wallis et le test des signes appariés, afin notamment d'étudier l'association entre la présence de *Legionella* et les facteurs de criticité (StatView 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Des régressions logistiques bivariées ont été réalisées pour prendre en compte en même temps différents facteurs (Stata 7, Stata Corporation – USA). La variable dépendante était la présence ou l'absence de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude des maisons de retraite, selon le seuil de concentration défini précédemment. Les variables indépendantes étaient la température de l'eau chaude au niveau des points d'usage et les scores de criticité des quatre composantes des réseaux d'eau chaude évoquées précédemment (réseau d'eau froide, production d'eau chaude, réseau d'eau chaude et point d'usage).

RESULTATS

Caractéristiques générales des réseaux d'eau des maisons de retraite

Le tableau 2 indique les principales caractéristiques des réseaux d'eau chaude au sein des établissements étudiés. Les maisons de retraite de Lorraine sont équipées de canalisations essentiellement en matériaux métalliques (88,2%) et plus précisément en cuivre (70,6%). Les ballons d'accumulation sont retrouvés dans 86,3% des systèmes de production et la température de l'eau chaude à la sortie de la production est <60°C pour la moitié des établissements (médiane : 55,0°C ; écart interquartile : 9,0°C). Les bras morts (situés soit en production, soit sur le réseau de distribution, soit au niveau des points d'usage) sont observés dans deux tiers des établissements. Seules 6 des 34 maisons de retraite ont instauré une chloration en continue sur le réseau d'eau, parfois même indépendamment d'un problème de légionelles. Enfin, la température de l'eau chaude aux points d'usage varie de 38°C à 60°C (médiane : 50,2°C ; écart interquartile : 7,4°C).

Tableau 2. Principales caractéristiques des réseaux d'eau des 34 maisons de retraite étudiées

Caractéristiques	Valeur (%)
Matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau chaude	
Matériaux métalliques (cuivre et acier galvanisé)	30 (88,2)
Matériaux de synthèse (PVC)	1 (2,9)
Co-existence de matériaux	3 (8,8)
Systèmes de production d'eau chaude	
Ballon d'accumulation	10 (29,4)
Instantané	5 (14,7)
Semi-instantané (instantané + ballon)	19 (55,9)
Température de l'eau chaude au système de production	
< 60°C	16 (47%)
≥ 60°C	9 (26,5%)
Données indisponibles	9 (26,5%)
Mitigeur général d'eau chaude	
Absent	25 (73,5%)
Présent	9 (26,5%)
Points d'eau peu ou pas utilisés (bras morts)	
Absent	12 (35,3)
Présent	22 (64,7)
Désinfection et Traitement de l'eau	
Chloration	6 (17,6)
Adoucisseur	19 (55,9)
Filmogène	15 (44,1)
Température de l'eau chaude au point d'usage	
< 50°C	17 (50)
≥ 50°C	17 (50)

Criticité des réseaux d'eau

La grille d'analyse du diagnostic réseau, intégrant les différents points critiques relevés sur le terrain (Tableau 1) a permis de caractériser la criticité de chacune des quatre composantes des réseaux d'eau (Tableau 3).

Ainsi, il est apparu qu'aucun établissement n'avait une maîtrise totale du risque légionelles dans les tous les postes du réseau d'eau (données non montrées) et que les trois quarts des sites avaient un réseau d'eau à risque concernant la présence de légionelles (score >=2).

Pour le poste « *production d'eau chaude sanitaire* », les points critiques les plus fréquemment rencontrés sont liés au traitement de l'eau et aux températures à la sortie du système de production qui étaient pour 47% des sites <60°C. Pour le traitement de l'eau, le point critique observé est soit une absence totale de vérification des quantités de produits consommés (quantité de sel dans l'adoucisseur, chlore, ...) et de leurs réglages, soit une absence totale de nettoyage et de désinfection des différents éléments composant le ou les traitement(s) de l'eau. Concernant le poste « *réseau de distribution d'eau chaude* », la présence de bras morts (65% des sites) sur le réseau général et l'absence d'un calorifugeage intégral du réseau d'eau chaude sanitaire expliquent une maîtrise du risque légionelles insuffisante (score 2) voire déficiente (score 3). Pour la composante « *points d'usage* », les points critiques relevés concernent d'une part la présence de tuyaux borgnes et l'absence de maintenance et de désinfection, laissant s'installer dépôts et tartre, et d'autre part une température mesurée <50°C (50% des sites), contrairement aux directives de la réglementation française. L'absence totale de maîtrise du risque légionelles a été identifiée seulement pour cette composante du réseau et ce pour un seul site.

Tableau 3. Scores de criticité des réseaux d'eau des maisons de retraite selon les quatre postes (n=34)

	Réseau d'eau froide	**Production d'eau chaude sanitaire**	**Réseau de distribution d'eau chaude**	**Points d'usage**
Scores de criticité no (%)				
score = 1	16 (47,0)	7 (20,6)	4 (11,8)	5 (14,7)
score = 2	17 (50,0)	18 (52,9)	25 (73,5)	11 (32,3)
score = 3	1 (3,0)	9 (26,5)	5 (14,7)	17 (50,0)
score = 4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,0)

Contamination en légionelles des réseaux d'eau chaude

Sur la période d'étude (octobre 2003 à novembre 2005), 338 prélèvements d'eau chaude ont été analysés, provenant de 169 douches utilisées par les patients. La majorité des échantillons d'eau présentent des niveaux de légionelles inférieurs au seuil de détection des méthodes utilisées (Tableau 4).

Au total, seuls 83 échantillons d'eau (24,6%) prélevés sur 15 sites (44,1%) sont contaminés par au moins une *Legionella* cultivable (UFC) par litre, parmi lesquels 65 le sont par *L. pneumophila* (Tableau 4). La concentration de 10^3 UFC.L^{-1} en *Legionella sp.* cultivables est atteinte pour 59% des échantillons positifs et la concentration de 10^4 UFC.L^{-1} en *Legionella sp.* cultivables est mesurée dans 30,1% des cas.

La technique d'analyse par biologie moléculaire (FISH) a permis de détecter des légionelles dans 48,5% des eaux chaudes avec une concentration maximale atteignant 7,3 x 10^6 *Legionella*-FISH.L^{-1}.

Près de la moitié des échantillons présente des concentrations en légionelles hybridées (FISH) $\geq 10^5$ *Legionella*.L^{-1}. La méthode d'hybridation *in situ* permet de mettre en évidence plus de légionelles dans les eaux chaudes de douche que la culture (Tableau 4) ($p<10^{-4}$).

Les légionelles constituent qu'une faible proportion de la population bactérienne des réseaux de distribution d'eau chaude puisque la population de *Legionella* (FISH/DAPI) représente 0,23% et la fraction de légionelles cultivables (UFC/DAPI) seulement 0,02% de la population bactérienne totale. La fraction de légionelles cultivables parmi la population de légionelles (UFC/FISH) ne représente que 8,3%.

Tableau 4. Caractéristiques microbiologiques des réseaux d'eau des 34 maisons de retraite étudiées

	Nombre d'échantillons positifs (%)	**Moyenne géométrique** [a]	**Médiane** [a]	**Concentration minimum** [a]	**Concentration maximum** [a]
***Legionella spp.* (UFC.L^{-1})**	83/338 (24,6)	$3,91 \times 10^3$	$1,40 \times 10^3$	$2,00 \times 10^2$	$2,30 \times 10^6$
$\geq 10^3$	49 (14,5)				
$\geq 10^4$	25 (7,4)				
***L. pneumophila* (UFC.L^{-1})**	65/338 (19,2)	$2,07 \times 10^3$	$1,40 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$	$2,47 \times 10^5$
$\geq 10^3$	36 (10,6)				
$\geq 10^4$	17 (5,0)				
***Legionella* FISH (Cellules.L^{-1})**	164/338 (48,5)	$1,05 \times 10^5$	$9,02 \times 10^4$	$9,02 \times 10^3$	$7,28 \times 10^6$
$\geq 10^4$	149 (44,1)				
$\geq 10^5$	75 (22,2)				
Bactéries totales (Cellules.L^{-1})	338	$5,65 \times 10^7$	$7,17 \times 10^7$	$4,94 \times 10^5$	$1,19 \times 10^9$

[a] calcul réalisé pour les concentrations $\geq$ LD : UFC $\geq 1,0 \times 10^2$ CFU.L^{-1} ; FISH $\geq 9,0 \times 10^3$ cellules.L^{-1}.

La présence de légionelles dans les échantillons d'eau chaude est liée à la saison (Tableau 5) ($p<10^{-4}$) ; les légionelles ont été plus fréquemment retrouvées pendant le semestre le plus froid (automne et hiver). Il y a une évolution au cours du temps de la présence de légionelles cultivables dans les prélèvements d'eau chaude de douches ($p<10^{-4}$) des maisons de retraite ; *Legionella* cultivable était détectée dans 54,8% des échantillons d'eau analysés en 2003 et dans 0,8% en 2005. De plus, la fréquence d'établissements positifs en légionelles a été divisée par sept en trois ans passant de 75% à 11% (données non montrées).

Tableau 5. Facteurs reliés à la présence de *Legionella* cultivable dans les échantillons d'eau chaude de douche (analyses bivariées).

Facteurs	**Echantillons positifs (%)**	**p***
Année		**$<10^{-4}$**
2003	23/42 (54,8)	
2004	59/226 (26,1)	
2005	1/120 (0,8)	
Saisons		**$<10^{-4}$**
Printemps + Eté	34/202 (16,8)	
Automne + Hiver	49/136 (36,0)	

* Test du chi-deux de Pearson

Facteurs de risque expliquant la contamination en légionelles des réseaux d'eau chaude

La présence ou l'absence de *Legionella* (détectée soit par culture soit par hybridation *in situ*) dans les eaux chaudes de douche a été reliée au score de criticité pour chacune des quatre composantes du diagnostic réseau (Tableau 6). Les caractéristiques du *réseau d'eau froide*, alimentant la production d'eau chaude, répertoriées lors du diagnostic réseau de chaque établissement ne sont pas liées à la présence/absence de *Legionella* dans l'eau chaude des douches.

Par contre, il y a une relation statistiquement significative entre la présence de légionelles cultivables et l'observation de facteurs à risque (mesurée par un score de criticité) au niveau des postes « *production d'eau chaude* » ($p<10^{-2}$), « *réseau de distribution d'eau chaude* » ($p<10^{-4}$) et « *points d'usage* » (p=0,01). Cette relation suit un gradient croissant : plus les facteurs de risque sont observés sur le réseau (i.e. plus les scores de criticité sont élevés), plus le risque de présence de *Legionella* augmente.

De même, l'observation de facteurs de risque sur le réseau d'eau est liée à la présence de légionelles détectées par FISH selon aussi un gradient logique : plus le « *réseau de distribution d'eau chaude* » (p=0,04) et les « *points d'usage* » (p=0,05) présentent des facteurs de risque et donc des scores élevés, plus le risque de présence de *Legionella*-FISH augmente.

La présence de légionelles est corrélée négativement à la température de l'eau chaude quelle que soit la technique de détection (données non présentées).

Par ailleurs, les facteurs de risque observés pour le poste « *points d'usage* » sont reliés aux trois autres postes du réseau d'eau. En effet, ils sont corrélés positivement à la fois aux facteurs de risque observés pour « *le réseau d'eau froide* » (r = 0,21 ; p=0,09), pour la « *production d'eau chaude* » (r = 0,31 ; p=0,01), et pour le « *réseau de distribution d'eau chaude* » (r = 0,33 ; p<0.01).

Tableau 6. Relation statistique entre le score de criticité calculé pour chacune des quatre composantes du diagnostic réseau et la présence/absence de légionelles dans l'eau chaude des douches (et p value)

Composantes du réseau d'eau	**Criticité**	***Legionella* cultivable (p*)**	***Legionella* FISH (p*)**
Réseau d'eau froide alimentant la production d'eau chaude	scores de 1 à 3	0,58	0,42
Production d'eau chaude	scores de 1 à 3	$< 10^{-2}$	0,62
Réseau de distribution d'eau chaude	scores de 1 à 3	$<10^{-4}$	0,04
Points d'usage	scores de 1 à 4	0,01	0,05
Température de l'eau chaude au point d'usage	Mesure (°C)	0,05	0,05

* Test d'égalité des populations de Kruskall-Wallis

Au-delà de l'approche qualitative décrite ci-dessus, nous avons tenté d'établir une relation quantitative entre le score de chacun des postes du réseau d'eau chaude et la présence de légionelles dans l'eau (mesurée par FISH et UFC) à l'aide d'un modèle de régression logistique (la valeur 1 du score étant prise comme référence). Seuls les facteurs de risque statistiquement liés à la présence de *Legionella* au seuil de $p<0,10$ ont été introduits dans le modèle multivarié (Tableau 7). Cette relation est retrouvée pour chaque composante du réseau et pour les deux méthodes de détection utilisées (culture ou FISH). Ainsi, des scores élevés de criticité (≥ 3) sont associés à un risque fortement augmenté de détecter des légionelles cultivables dans les eaux chaudes, qu'ils soient relevés au niveau de la « *production d'eau chaude* » (O.R. = 26,00 ; [95% I.C.=1,3 à 503,0], p= 0,001), du « *réseau de distribution d'eau chaude* » (O.R. = 224,00 ; [95% I.C.=3,9 à 12845,8], $p< 10^{-4}$) et dans une moindre mesure aux « *points d'usage* » (O.R. = 8,47 ; [95% I.C.=0,8 à 87,4] ; p= 0,08) (Tableau 7). De plus, plus les températures de l'eau chaude sont élevées, moins les *Legionella* se développent sur milieu gélosé. Ces résultats ne sont pas retrouvés lorsque la contamination en légionelles est appréciée par FISH sauf pour le score concernant les « *points d'usage* » (O.R. = 10,80 pour un score ≥ 3, [95% I.C. = 1,0 à 116,7], p= 0,01).

Tableau 7. Régression logistique entre les scores de criticité des réseaux d'eau chaude et la présence de légionelles.

Composantes du réseau d'eau	**Criticité**	**O.R. (95% I.C.)**	
		***Legionella* cultivable**	***Legionella* FISH**
Température au point d'usage	Mesure (°C)	0,84 (0,74 – 0,95) **	0,93 (0,84 – 1,03)
Production d'eau chaude	score = 2	5,72 (0,60 – 53,99) *	ND
	score = 3	26,00 (1,34 – 502,99) **	ND
Réseau général de distribution d'eau chaude	score = 2	6,86 (0,37 – 127,20)	2,00 (0,36 – 11,20)
	score = 3	224,00 (3,91 – 12845,76) **	18,00 (0,57 – 571,02)
Points d'usage	score = 2	2,64 (0,25 – 27,97)	6,23 (0,57 - 67,77)
	score $\geq$ 3	8,47 (0,82 – 87,44) *	10,80 (0,99 – 116,68) **

* significatif à $p < 0,10$; ** significatif à $p \leq 0,01$; ND = Non Déterminé

DISCUSSION

Ce travail a permis d'évaluer la contamination des réseaux d'eau chaude en *Legionella* dans un ensemble de maisons de retraite du nord-est de la France. L'observation des caractéristiques générales des réseaux et la détermination de leurs points critiques ont permis d'expliquer et de prédire la présence de la bactérie pathogène *Legionella* dans l'eau chaude.

Occurrence des légionelles dans les réseaux d'eau chaude

Au cours de la période d'étude, des légionelles cultivables ont été détectées dans un quart des prélèvements d'eau chaude effectués dans les maisons de retraite. Ces résultats sont conformes à d'autres études réalisées dans des établissements collectifs en Italie (habitations privées : 22,6 %), en Finlande (appartements : 31 %) et aux Etats-Unis (hôpitaux : 34 %) (Borella *et al.*, 2004 ; Zacheus et Martikainen, 1994 ; Hoebe et Kool, 2000). Toutefois, cette contamination des réseaux d'eau chaude est décroissante depuis 2003 et bien inférieure à celle observée de 1999 à 2001 par Barbotte *et al.* dans la même région dans des d'établissements de santé (hôpitaux et maisons de retraite) où 61% des douches prélevées étaient contaminées (Barbotte *et al.,* 2002). L'application de la circulaire française de 2002 relative aux *Legionella* dans les établissements de santé (DGS, 2002) est sans doute la principale explication de cette amélioration des réseaux d'eau. Cette amélioration de la qualité des eaux chaudes s'est poursuivie au cours de notre étude puisque le nombre d'établissements positifs à *Legionella* cultivable a été divisé par sept sur les trois années d'observation (2003-2005).

La concentration en *Legionella* cultivable, d'une moyenne géométrique de 3.9×10^3 UFC.L^{-1} atteint un maximum de 2.3×10^6 UFC.L^{-1}. Il s'agit d'une concentration importante, largement supérieure à ce qui a été décrit dans les rares études réalisées sur des réseaux d'eau collectifs où un maximum de 10^5 UFC.L^{-1} avait été observé (Borella *et al.*, 2004 ; Zacheus et Martikainen, 1994). La forte présence de l'espèce *L. pneumophila*, i.e. dans 78% des échantillons positifs d'eau chaude est corroborée par plusieurs études qui ont évaluées sa présence entre 69 et 100 % des cas respectivement (Leoni *et al.,* 2005 ; Borella *et al.,* 2004 ; Zacheus et Martikainen, 1994). Ces résultats soulignent le risque sanitaire encouru par les populations âgées, résidentes de maisons de retraite, car *L. pneumophila* est l'espèce majoritairement responsable des légionelloses dans le monde (Aurell *et al.*, 2003 ; Helbig *et al.,* 2002 ; Yu *et al.,* 2002).

Dans notre étude, la contamination plus fréquente des réseaux d'eau chaude par *Legionella* en hiver qu'en été, va à l'encontre d'autres travaux qui n'observaient pas de corrélation claire entre la saison et la contamination en légionelles (Turetgen *et al.,* 2005 ; Leoni *et al.,* 2001 ; Hedges *et al.*, 1991). Toutefois, notre étude ne peut décrire véritablement des variations saisonnières faute d'une observation de l'occurrence de la bactérie dans les réseaux d'eau tout au long de l'année.

S'il est généralement reconnu que la culture sous-estime la présence de *Legionella* (Nyström, 2001, Hussong *et al.*, 1987), l'utilisation d'autres techniques, comme FISH, permet de palier ce problème car c'est une technique plus rapide, plus sensible et qui détecte des légionelles non cultivables (Dutil *et al.,* 2006 ; Buchbinder *et al.,* 2002). Ainsi, dans notre étude, les légionelles cultivables représentaient seulement 8% de la population en *Legionella* détectée par FISH dans les réseaux d'eau. La détection par FISH n'est pas à proprement parlé une technique de mesure de la viabilité bactérienne (appréciée par multiplication cellulaire) (McKillip *et al.*, 1998), par contre elle est reconnue par certains spécialistes comme un marqueur d'activité physiologique de la bactérie (Manz *et al.,* 1995 ; Joux et Lebaron, 2000).

Approche prédictive de la contamination par Legionella des réseaux d'eau chaude à l'aide d'un diagnostic réseau

Pour les 34 maisons de retraite de notre étude, les quatre composantes de chaque réseau d'eau ont été analysées pour leur risque de contamination par *Legionella* : de l'alimentation en eau froide alimentant la production jusqu'aux points d'usage. Borella *et al.* (2004) avaient tenté une analyse similaire sur des réseau d'eau chaude d'hôtels en s'appuyant sur l'observation de caractéristiques générales et physico-chimiques du réseau d'eau. Ils ont conclu que le risque de contamination des eaux chaudes par *Legionella* était croissant avec l'âge des hôtels et décroissant avec des teneurs en oxygène dissous >3.0 $mg.L^{-1}$ et une dureté totale >20°F, sans avoir pris en compte ni la présence de bras morts, ni l'état des canalisations et des points d'usage. Par contre, dans notre étude, en prenant compte de la totalité du réseau d'eau chaude, nous avons constaté une relation entre la présence de *Legionella* aux points de douche des établissements et les scores de criticité au niveau du réseau d'eau ainsi qu'avec la température mesurée au point d'usage.

Des scores élevés de criticité (≥ 3) en « *production d'eau chaude* » sont associés à un risque fortement augmenté de détecter des légionelles cultivables dans les eaux chaudes. Parmi les facteurs de risque relevés en « *production d'eau chaude* » (Tableau 1), deux principaux points critiques ressortent de notre étude et ont déjà été décrits dans la littérature comme : la température et les systèmes de production d'eau chaude avec notamment les ballons d'accumulation. La température de l'eau chaude au niveau du système de production était près d'une fois sur deux <60°C, ce qui peut expliquer la colonisation par *Legionella* (Lee *et al.*, 1988 ; Wadowsky *et al.*, 1982). D'ailleurs, nos données montrent aussi clairement qu'au point d'usage, une *température de l'eau chaude* élevée joue un rôle protecteur vis-à-vis de la contamination par *Legionella.* Ces résultats confortent la réglementation en vigueur, notamment en France, où une température aux points d'usage entre 50°C et 55°C est recommandée (DGS 2002).

Concernant les installations de production d'eau chaude, un ballon d'accumulation était présent dans 29 maisons de retraite.

Certains auteurs ont relié la présence de *Legionella* à l'ancienneté, au manque de maintenance et aux dépôts solides présents en bas de ces ballons (Alary et Joly, 1992 ; Vickers *et al.,* 1987 ; Fabbi *et al.*, 1998 ; Wadowsky *et al.*, 1982).

D'autre part, notre étude a permis de montrer que les points critiques relevés au niveau du « *réseau de distribution d'eau chaude* » prédisposeraient à la contamination de l'eau par *Legionella.* La présence de tuyaux borgnes pour 64% des sites analysés, reliée indirectement à la stagnation de l'eau, est connue pour favoriser la présence de *Legionella* (Ciesielski *et al.*, 1984). Le problème de corrosion des canalisations n'a pas été directement pris en compte par la grille mais il pourrait favoriser la présence d'ions comme le fer et par conséquent la présence de *Legionella* dans l'eau (States *et al.*, 1987).

Au cours des prélèvements d'eau, la présence de tartre et de dépôts insalubres (moisissures) a pu être observée à plusieurs reprises au niveau des « *points d'usage* » favorisant la présence de légionelles cultivables dans les réseaux (Vickers *et al.*, 1987, Bezanson *et al.*, 1992 ; Walker *et al.*, 2000).

La grille des points critiques utilisée dans ce travail est le fruit d'une large et longue expérience des professionnels du chauffage en relation avec les biologistes et hygiénistes, en confrontant les observations des ingénieurs et celles de la culture bactérienne. Aujourd'hui, l'utilisation de la technique FISH présente d'un point de vue de la surveillance de nombreux atouts (rapidité, sensibilité, ...). C'est pourquoi il était intéressant de confronter les paramètres de prédiction du risque *Legionella* avec ces deux techniques de détection. Il s'est avéré que la relation entre la contamination en *Legionell*a et les scores de criticité est plus forte pour les *Legionella* cultivables que pour la population de *Legionella* évaluée par FISH. L'algorithme ayant servit au calcul des scores de criticité, et auquel nous n'avons pas accès (propriété industrielle) peut avoir orienté ces résultats en affectant des coefficients forts à des paramètres clés de la survie de légionelles comme la température de l'eau, ce paramètre influençant directement la cultivabilité des légionelles (Stout *et al.,* 1986 ; Wadowsky *et al.,* 1985). Seules des études complémentaires, en modifiant les coefficients de ce paramètre par exemple, permettront de valider cette hypothèse, ce qui est déjà envisagé pour des développements futurs. Pour l'heure, notre étude montre que la grille des scores de criticité est pertinente pour son objet qui est de prédire le risque de présence de *Legionella* cultivables.

CONCLUSION

Les maisons de retraite lorraines constituent un lieu à risque d'exposition des personnes âgées aux *Legionella*. En effet, nous avons montré que sa contamination des réseaux d'eau est fréquente et en fortes concentrations, avec de plus, une présence importante de *L. pneumophila*. La grille d'analyse des points critiques, et les grilles fondées sur les mêmes principes, qui peuvent exister ailleurs, s'avèrent être de bons outils pour la gestion du risque légionelles. Dans nos conditions expérimentales, les facteurs de risque de contamination par *Legionella* sont les points critiques présents au niveau des points d'usage, mais surtout au niveau des réseaux de distribution d'eau chaude. Notre étude montre que la grille des scores de criticité est pertinente pour son objet qui est de prédire le risque de présence de *Legionella* cultivables. Ce travail souligne par ailleurs que la maîtrise du risque à *Legionella* est multiparamétrique et doit être évaluée en tenant compte de la globalité des points critiques des réseaux d'eau.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par l'AFSSE (appel à proposition, 2003), le ministère français de la santé et Véolia. M. Deloge-Abarkan était allocataire d'une bourse doctorale d'ADEME et EDF. La participation de Lahoucine Benamghar à l'analyse statistique est remerciée. Les directeurs des maisons de retraite sont aussi remerciés ; ils ne peuvent pas tous être cités. La grille d'analyse des points critiques des réseaux d'eau a été élaborée par Véolia Environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.F.N.O.R. (2003) Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*, Norme AFNOR T90-431, Septembre 2003.

Alary M. and Joly J.R. (1992) Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by *Legionellae, J. Infect. Dis.*, **165**, 565-569.

Amann R.I., Ludwig W. and Schleifer K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143-149.

Aurell H., Etienne J., Forey F., Reyrolle M., Girardo P., Farge P., Decludt B., Campese C., Vandenesch F. and Jarraud S. (2003) *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France, *J. Clin. Microbiol.*, **41**(7), 3320-3322.

Barbotte E., Chemardin J., Blech M.F., Paquin J.L., Lance P. and Hartemann P. (2002) Deux ans et demi de surveillance environnementale de *Legionella* en Lorraine : premiers constats, premières solutions, *B.E.H.*, 37, 179-180.

Bert G. (2005) Legionellose prevention in the netherlands, *http://www.inece.org/conference/7/vol1/25_Groen.pdf*, 155-157.

Bezanson G., Burbridge S., Haldane D., Yoell C. and Marrie T. (1992) Diverse populations of *Legionella pneumophila* present in the water of geographically clustered institutions served by the same water reservoir, *J. Clin. Microbiol.*, **30**(3), 570-576.

Borella P., Montagna T.M ., 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**(3), 457-464.

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**(3-4), 241-245.

Campèse C., Jarraud S., Bitar D., Maine C. and Che D. (2005) Les légionelloses survenues en France en 2004, *B.E.H.*, 26, 129-132.

Cielsielski C.A., Blaser M.J. and Wang W.L. (1984) Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(5), 984-987.

Direction Générale de la Santé (2005) Circulaire DGS/SD7A/DHOS/E4/DGAS/SD2/2005/493 du 28 octobre 2005 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées.

Direction Générale de la Santé (2002) Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243 du 22 avril 2002, relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.

Dutil S., Tessier S., Veillette M., Laflamme C., Meriaux A., Leduc A., Barbeau J. and Duchaine C. (2006) Detection of *Legionella* spp. by fluorescent in situ hybridization in dental unit waterlines, *J. Appl. Microbiol.*, **100**(5), 955-963.

EPA (United States Environmental Protection Agency) (1999) *Legionella*: Human Health Criteria Document, Washington, 122pp.

Exner M., Kramer M.H. and Pleischl S. (2002) Strategies for prevention and control of legionnaires'disease in germany, In *Legionella*, 444 pages, Washington : 325-29, Editors : R. Marre, Y Abu Kwaik, C. Bartlett, N.P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker, P.C. Lück.

Fabbi M., Pastoris M.C., Scanziani E., Magnino S. and Di Matteo L. (1998) Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf, *J. Clin. Microbiol.*, **36**(7), 1942-1947.

Fields B.S., Benson R.F. and Besser R.E. (2002) Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clin. Microbiol.*, **15**(3), 506-526.

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**(1), 9-16.

Green P.N. (1993) Efficacy of biocides on laboratory-generated *Legionella* biofilms, *Lett. Appl. Microbiol.*, **17**, 158-161.

Green P.N. and Pirrie R.S. (1993) A laboratory apparatus for the generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms, *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 388-393.

Grimm D., Merkert H., Ludwig W., Schleifer K.H., Hacker J. and Brand B.A. (1998) Specific detection of *Legionella pneumophila* construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(7), 2686-2690.

Hayden R.T., Uhl J.R., Qian X., Hopkins M.K., Aubry M.C., Limper A.H., Lloyd R.V. and Cockerill F.R. (2001) Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, *in situ* hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture, *J. Clin. Microbiol.*, **39**(7), 2618-2626.

Hedges L.J. and Roser D.J. (1991) Incidence of *Legionella* in the urban environment in Australia, *Wat. Res.*, **25**(4), 393-399.

Helbig J.H., Bernander S., Castellani Pastoris M., Etienne J., Gaia V., Lauwers S., Lindsay D., Luck P.C., Marques T., Mentula S., Peeters M.F., Pelaz C., Struelens M., Uldum S.A., Wewalka G. and Harrison T.G. (2002) Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **21**(10), 710-716.

Hoebe C.J. and Kool JL. (2000) Control of *legionella* in drinking-water systems, *Lancet*, **355**(9221), 2093-2094.

Hussong D., Colwell R.R., O'Brien M., Weiss E., Pearson A.D., Weiner R.M. and Burge W.D. (1987) Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media, *Bio/Technology*, 5, 947-950.

Joseph C.A. (2004) Legionnaires'disease in Europe, *Epidemiol. Infect.*, **132**, 417-424.

Joux F. and Lebaron P. (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level, *Microbes Infect.*, **2**(12), 1523-1535.

Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.N., Schreckenberger P.C. and Washington C.W. (1997) *Legionella*, p 473-489, *In* Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Fifth edition, ville????.

Lee T.C., Stout J.E. and Yu V.L. (1988) Factors predisposing to *Legionella pneumophila* colonization in residential water systems, *Arch. Environ. Health,* **43**(1), 59-62.

Leoni E., De Luca G., Legnani P.P., Sacchetti R., Stampi S. and Zanetti F. (2005) *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems, *J. Appl. Microbiol.*, **98**(2), 373-379.

Leoni E., Legnani P.P., Bucci Sabattini M.A. and Righi F. (2001) Prevalence of *Legionella spp.* in swimming pool environment, *Water Res.*, **35**(15), 3749-3753.

Mahbubani M.A., 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**(3), 175-187.

Manz W., Amann R., Szewyk R., Szewzyk U., Strenström 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**, 29-39.

Marston B.J., Lipman H.B. and Breiman R.F. (1994) Surveillance for Legionnaires' disease, *Arch. Intern. Med.*, **154**, 2417-2422.

McKillip J.L., Jaykus L.A. and Drake M. (1998) rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(11), 4264-4268.

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**(Pt 11), 3121-3126.

Nyström T. (2001) Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and deat, A*rch. Microbiol.*, **176**(3), 159-164.

Plouffe J.F., Webster L.R. and Hackman B. (1983) Relationship between colonization of hospital buildings with *Legionella pneumophila* and hot water temperatures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**(3), 769-770.

Reyrolle M., Ratat C., Leportier M., Jarraud S., Freney J. and Etienne J. (2004) Rapid identification of *Legionella pneumophila* serogroups by latex agglutination, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23,** 864-866.

Riffard S., Vandenesch F., Reyrolle M. and Etienne J. (1996) Distribution of mip-related sequences in 39 species (48 serogroups) of *Legionellaceae*, *Epidemiol. Infect.*, **117**(3), 501-506.

Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V. and Keevil C.W. (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(5), 1585-1592.

Saby S., Sibille I., Mathieu L., Paquin J.L. and Block J.C. (1998) Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(4), 1564-1569.

Snelling W.J., Moore J.E., McKenna J.P., Lecky D.M. and Dooley J.S. (2006) Bacterial-protozoa interactions ; an update on the role these phenomena play towards human illness, *Microbes Infect.*, **8**(2), 578-587.

Standards Australia (1998) Waters examination for *legionellae* including *Legionella pneumophila*, Standars Australia, Sydney, Australia.

States S.J., Conley L.F., Ceraso M., Stephenson T.E., Wolford R.S., Wadowsky R.M., McNamara A.M. and Yee R.B. (1987) Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**(5), 1149-1154.

Steinert M., Hentschel U. and Hacker J. (2002) *Legionella pneumophila* : an aquatic microbe goes astray, *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**,149-162.

Steinert M., Emödy L., Amann R. and Hacker J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(5), 2047-2053.

Stout J.E., Best M.G. and Yu V.L. (1986) Susceptibility of members of the family *Legionellaceae* to thermal stress : implications for heat eradication methods in water distribution systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**(2), 396-399.

Turetgen I., Sungur E.I. and Cotuk A. (2005) Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems, *Environ. Monit. Assess.*, **100**(1-3), 53-58.

Vickers R.M., Yu V.L., Hanna S.S., Muraca P., Diven W., Carmen N. and Taylor F.B. (1987) Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study, *Infect. Control*, **8**(9), 357-363.

Wadowsky R.M. and Yee R.B. (1985) Effet of non *Legionellacae* bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(5), 1206-1210.

Wadowsky R.M., Yee R.B., Mezmar L., Wing E.J. and Dowling J.N. (1982) Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**(5), 1104-1110.

Walker J.T., Bradshaw D.J., Bennett A.M., Fulford M.R., Martin M.V. and Marsh P.D. (2000) Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(8), 3363-3367.

Winn W.C. (1988) Legionnaires disease : historical perspective, *Clin. Microbiol.*, **1**(1), 60-61.

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. (2000) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey, *J. Infect. Dis.*, **186**(1), 127-128.

Zacheus O.M. and Martikainen P.J. (1994) Occurrence of legionellae in hot water distribution systems of Finnish apartment buildings, *Can. J. Microbiol.*, **40**(12), 993-999.

4 DISCUSSION

4.1 QUANTIFICATION DE *LEGIONELLA* DANS LES EAUX CHAUDES SANITAIRES

L'objet de cette étude était d'estimer la présence et la concentration de *Legionella* dans les eaux chaudes en utilisant de manière concomitante deux techniques d'analyse, la culture actuellement méthode de référence pour la recherche de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires, et l'hybridation *in situ* permettant de quantifier au travers de sondes nucléotidiques la population de légionelles des réseaux d'eau chaudes. Des prélèvements réguliers ont donc été réalisés aux points de douche de patients résidant dans 34 maisons de retraite de Lorraine, pendant deux ans et demi, d' octobre 2003 à novembre 2005.

Seulement un cinquième des établissements présentaient des concentrations en *Legionella* cultivables supérieures à la limite réglementaire de 10^3 UFC.L^{-1}. L'application de la circulaire française de 2002 relative aux concentrations seuils en *Legionella* dans les établissements de santé [DGS, 2002] a sans doute contribué à l'amélioration de la gestion des réseaux d'eau chaude au travers d'actions préventives et/ou correctives de manière à limiter le risque légionelles.

Deux types de prélèvements d'eau ont été effectué à chaque point d'usage : le 1er jet afin de disposer de données quant à la contamination liée à la stagnation d'eau au point d'usage ; et la purge après un écoulement de 7 minutes de l'eau chaude afin de disposer de la contamination réelle du réseau de distribution de l'eau chaude. Comme attendu, les eaux du 1er jet sont corrélées positivement aux eaux de purge en terme de *Legionella*. Il s'est avéré que les concentrations en *Legionella* sont plus élevées pour les eaux de 1er jet que les eaux de purge, du fait de la stagnation de l'eau favorisant la présence et la croissance de *Legionella* [Ciesielski *et al.*, 1984].

L'analyse de chaque échantillon d'eau par la méthode FISH a permis de palier au problème de sous-estimation de présence de *Legionella,* reconnue avec la méthode de culture [Nyström, 2001, Hussong *et al.*, 1987]. En effet, il s'est avéré dans notre étude que *Legionella* cultivables représentaient seulement 12% des *Legionella* détectées par FISH. Même si la méthode FISH n'est pas à proprement parlé une technique de mesure de la viabilité bactérienne [McKillip *et al.*, 1998], elle est reconnue comme marqueur d'une activité physiologique [Manz *et al.*, 1995 ; Joux et Lebaron, 2000].

4.2 RELATIONS ENTRE DIAGNOSTIC RESEAU ET PRESENCE DE *LEGIONELLA*

En complément des niveaux de concentrations en *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude sanitaire, il semblait intéressant d'expliquer leur présence à partir des données des diagnostics réseaux mises à notre disposition.

L'objectif n'était pas de valider la grille de scores de criticité pour chaque poste du réseau d'eau développé dans cette étude par un grand groupe industriel, mais de tenter de relier les éléments des réseaux d'eau à la présence de *Legionella*.

La première observation a été de constater que les trois quarts des établissements étudiés présentaient soit des insuffisances soit des déficiences au niveau de la maîtrise du risque légionelles, tous postes du réseau d'eau confondus (de l'alimentation en eau froide aux points d'usage en passant par la production et la distribution d'eau chaude). Ainsi, les points critiques identifiés au niveau du réseau d'eau et la mesure des températures au points d'usage se sont avérés être reliés à la contamination en *Legionella*.

Tout d'abord, la présence de *Legionella* cultivables a été corrélée à la criticité de la production d'eau chaude sanitaire. En effet, la température de l'eau chaude au niveau du système de production était pour 47% des sites <60°C, ce qui peut expliquer la colonisation par *Legionella* [Lee *et al.*, 1988 ; Wadowsky *et al.*, 1982]. D'autre part, les facteurs de risque du réseau de distribution d'eau chaude prédisposeraient à la colonisation de *Legionella*. Il est certain que la présence de tuyaux borgnes pour 64% des sites analysés, reliés à la stagnation de l'eau, permettent de favoriser la présence de *Legionella* [Ciesielski *et al.*, 1984].

Enfin, les points critiques recensés au niveau des points d'usage permettent aussi d'expliquer la présence de *Legionella*. Les pommeaux de douche utilisés moins d'une fois par semaine et le défaut de maintenance laissant s'y installer tartre et dépôts insalubres [Vickers *et al.*, 1987, Bezanson *et al.*, 1992 ; Walker *et al.*, 2000] sont les paramètres explicatifs de cette association.

Dans nos essais, la température de l'eau chaude, plus elle est élevée, joue un rôle protecteur contre la colonisation de *Legionella*. Ce résultat est confirmé par la littérature qui montre qu'avec une température inférieure à 50°C ou 60°C, la colonisation en *Legionella* est plus fréquente [Exner *et al.*, 2005 ; Borella *et al.*, 2004 ; Vickers *et al.*, 1987 ; Plouffe *et al.*, 1983]. Ces résultats sont intéressants puisque la réglementation française recommande une température aux points d'usage entre 50°C et 55°C [DGS 2002].

En conclusion, il s'est avéré que la grille d'analyse des points critiques établie sur la base du diagnostic réseau est un bon outil pour la gestion du risque légionelles. En effet, la probabilité de présence de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires de 34 maisons de retraite de Lorraine est fortement liée aux scores de criticité des postes « *points d'usage* » et « *réseau de distribution d'eau chaude* ».

4

AEROSOLS D'EAU CHAUDE DE DOUCHES ET CONTAMINATION EN LEGIONELLES

Sommaire

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 136
2 DETERMINATION ET CHOIX METROLOGIQUE DE COLLECTE DES *LEGIONELLA* AEROPORTEES 138
3 CONTAMINATION DES AEROSOLS PAR *LEGIONELLA* 151
3.1 SITES DE PRELEVEMENTS 151
3.2 CONDITIONS DE PRELEVEMENT DE L'AEROSOL DE DOUCHES 151
3.3 PRESENTATION DES RESULTATS 153
3.4 PARAMETRES PHYSIQUES CARACTERISTIQUES DU PRELEVEMENT 154
4 RELATION ENTRE LA CONTAMINATION DE L'EAU ET DES AEROSOLS DE DOUCHE 155
4.1 RESULTATS DE L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (ACP) 155
4.2 RELATION EXPLICITE ENTRE LES NIVEAUX DE CONTAMINATION EN LEGIONELLES DE L'EAU CHAUDE ET DE L'AEROSOL DE DOUCHE 158
5 DISCUSSION 160
5.1 BIOCOLLECTEURS ET AEROSOLS DE *LEGIONELLA* 160
5.2 QUANTIFICATION DE *LEGIONELLA* DANS LES AEROSOLS AMELIOREE PAR LA METHODE FISH 161
5.3 RELATION ENTRE TENEURS EN *LEGIONELLA* DE L'EAU CHAUDE ET DE L'AEROSOL DE DOUCHE 163

L'objectif de ce chapitre est de présenter la contamination en *Legionella* des aérosols d'eau chaude, mesurée aux points de douche d'une trentaine de maisons de retraite de Lorraine. Cette contamination des aérosols par *Legionella* sera mise en relation avec la contamination des eaux en *Legionella*, toutes deux mesurées au même point de douche, ainsi qu'avec les paramètres physiques spécifiques à chaque ambiance de prélèvement. L'objectif est de disposer de paramètres permettant de prédire avec une fiabilité correcte une éventuelle contamination de l'air par le germe pathogène *Legionella*, et par là de disposer d'indicateurs permettant d'agir en amont pour limiter l'exposition de personnes sensibles.

1 CONTEXTE DE L'ETUDE

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié les teneurs en *Legionella* des eaux chaudes des maisons de retraite et nous avons mis en relation la présence de légionelles avec les caractéristiques de réseaux d'eau afin de pouvoir disposer d'un outil prédictif et de gestion de la contamination des eaux chaudes sanitaires aux points d'usage à partir des données de diagnostic réseau. Cependant, bien que la réglementation actuelle, en France, n'assoie la gestion du risque qu'en se basant sur les teneurs en *Legionella* des eaux, la seule voie de transmission admise est l'inhalation d'aérosols contaminés en *Legionella* [Fields *et al.*, 2002] ; aucune transmission par voie orale d'eau contaminée n'a été recensée [Benhamou *et al.*, 2005].

En raison de l'absence de modèle mathématique sur la fonction eau/air, la mesure de *Legionella* uniquement dans l'eau ne permet pas de statuer validement sur le risque. Les quelques études disponibles sur les teneurs en *Legionella* dans l'eau et dans l'air au même point d'usage sont regroupées dans le tableau 4.1.

Tableau 4. 1 : Données de la littérature relatives aux concentrations en Legionella mesurées dans l'aérosol et dans l'eau.

Site	Principe de collecte de l'aérosol	Concentration dans l'eau ($UFC.L^{-1}$)	Concentration dans l'air ($UFC.m^{-3}$)	Références
Tour	Impaction en milieu liquide[1]	600	90	Ishimatsu *et al.*, 2001
Tour	Impaction en milieu liquide[1]	$9,0.10^6$	$2,3.10^3$	Breiman *et al.*, 1990b
Douche	Impaction en milieu solide[2]	$>2,0.10^5$	6	Bollin *et al.*, 1985
Douche	Impaction en milieu solide[2]	$>2,0.10^5$	3,5	
Douche	Impaction en milieu liquide[3]	$1,0.10^3$	0,27	Dennis *et al.*, 1984
Douche	Impaction en milieu liquide[3]	$1,0.10^3$	0,40	

[1] Impinger ; [2] Andersen ; [3] Cyclone

Quelle que soit la source génératrice d'aérosols (douche, tour aéroréfrigérante), aucune de ces études n'a démontré un lien entre la concentration dans l'eau et celle mesurée dans l'air en *Legionella.* Ce transfert est aléatoire suivant les équipements visés. Dans ces conditions, une concentration bactérienne élevée, au niveau du réservoir hydrique, ne présume en rien d'une dispersion aérienne. A l'inverse, des numérations faibles peuvent être sous-estimées par l'existence avérée des légionelles au sein de matrices, biofilms ou amibes libres ; la population de légionelles fixées ou intra-amibiennes n'étant pas accessible par la technique culturale, préconisée dans les contrôles réglementaires. En conséquence, il est difficile de s'assurer de la seule pertinence des mesures effectuées dans l'eau en terme d'évaluation du risque sanitaire.

Toutefois, l'étude de *Legionella* dans les aérosols a déjà été amorcée avec l'utilisation de différents principes de collecte d'air comme l'impaction sur milieu solide [Pascual *et al.*, 2001 ; Breiman *et al.*, 1990a et b ; Bollin *et al.*, 1985], l'impaction en milieu liquide [Ishimatsu *et al.*, 2001 ; Alvarez *et al.*, 1994 ; Breiman *et al.*, 1990b ; Dennis et Lee, 1988 ; Hambleton *et al.*, 1983 ; Berendt *et al.*, 1980], ou l'utilisation de cyclone [Mathieu *et al.*, 2006 ; Dennis *et al.*, 1984]. Mais la performance de ces biocollecteurs d'air n'a jamais été évaluée pour *Legionella* et nous ne disposons pas à l'heure actuelle de métrologie adéquate et consensuelle.

Le rôle de facteurs environnementaux, influençant la présence et la survie de bactéries aéroportées, dont *Legionella* dans le milieu aérien, a été décrit par de rares travaux. A notre connaissance, Hambleton *et al.*, [1983] et Ha [2005] ont montré que l'humidité relative et l'état physiologique influent sur la survie d'aérosol de *Legionella,* avec meilleure survie à 65% d'H.R. du germe aérosolisé. En l'absence de données spécifiques sur légionelles, des études sur d'autres bactéries aéroportées montrent également que des facteurs tels que les rayonnements ultraviolets et la teneur en oxygène de l'air induisent des dommages notamment au niveau de la membrane cytoplasmique et des acides nucléiques de la bactérie [Marthi *et al.*, 1990 ; Hess, 1965].

Ainsi, il est apparu indispensable de tenter de mettre en évidence les relations entre les teneurs de *Legionella* mesurées dans l'aérosol de douche, à l'aide de plusieurs biocollecteurs, avec les teneurs en *Legionella* mesurées dans l'eau chaude au même point et les facteurs physiques environnementaux enregistrés au moment des prélèvements.
Les campagnes de prélèvement d'aérosols ont été effectuées d'Octobre 2003 à Novembre 2005 dans chacune des maisons de retraite volontaires et au niveau de plusieurs points de douches utilisés par les patients et représentatifs de leur exposition. Elles ont servi à la recherche de *Legionella* aéroportée, à la fois par la méthode de culture et par la méthode d'hybridation *in situ*.

Ce chapitre s'organise en quatre parties : d'une part, des essais préliminaires portant sur la détermination de la méthodologie de collecte et d'analyse des aérosols de *Legionella* est présentée. Dans un deuxième temps, sont développés les résultats relatifs à la contamination en *Legionella* aéroportée des espaces douches des maisons de retraite, mais aussi les données relatives aux facteurs relatifs à l'ambiance de prélèvement. Ils permettent, dans un troisième temps, de disposer des relations explicites entre teneur de *Legionella* de l'eau et de l'aérosol. Enfin, une discussion générale des résultats est présentée.

2 DETERMINATION ET CHOIX METROLOGIQUE DE COLLECTE DES *LEGIONELLA* AEROPORTEES

La mise en œuvre de méthodes de mesures et de moyens analytiques était une étape préliminaire indispensable pour accéder à l'évaluation du niveau d'exposition des populations à des aérosols contaminés. L'effort métrologique a porté à la fois sur la caractérisation des techniques de prélèvement de bioaérosols, mais également sur l'utilisation et la comparaison de méthodes de détection de *Legionella*.
Les résultats présentés ci-après ont donc été menés indépendamment et avant l'étude dans les maisons de retraite. Ils portent d'une part sur la comparaison des trois principaux principes de collecte des bioaérosols lors d'essais réalisés dans un banc d'aérosolisation contrôlé ; d'autre part sur l'utilisation d'une nouvelle technique de détection de *Legionella* aérosolisée, la technique d'hybridation *in situ*. Nous présentons ensuite l'application de ces moyens de collecte et d'analyse des aérosols de légionelles dans les conditions environnementales avec la procédure de prélèvement des bioaérosols au niveau de douches qui a ensuite été employée durant l'étude sur les maisons de retraite.

La première partie de l'étude présente les analyses préalables qui ont été réalisées en laboratoire équipé d'un banc d'aérosolisation, permettant de générer des aérosols de légionelles dans des conditions maîtrisées (collaboration avec le Centre Scientifique et Technique du Bâtiment). La réalisation d'expérimentations en conditions stables et contrôlées a permis d'évaluer l'influence des

biocollecteurs, basés sur trois principes de collecte d'air, sur la cultivabilité de *Legionella* aéroportée. De manière concomitante à la culture, la technique d'hybridation *in situ* a été testée sur les échantillons d'air pour connaître sa faisabilité en terme de détection d'aérosols bactériens.

Dans une seconde phase de l'étude, des essais de collecte d'aérosols de légionelles générés par des douches ont été réalisés dans deux établissements de santé (hôpital et maison de retraite) choisis pour leurs problèmes récurrents de contamination en légionelles. Ces essais ont été réalisés afin d'apprécier (i) l'abondance des *Legionella* aéroportées générées par de l'eau chaude de douche et (ii) la faisabilité des méthodologies employées [principe de collecte-technique d'analyse] pour détecter les aérosols de légionelles.

Cette partie est présentée sous la forme d'une publication acceptée dans la revue *Journal Environmental Monitoring* sous le titre « Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) ».

Journals Journal of Environmental Monitoring Advance Articles DOI: 10.1039/b610737k
J. Environ. Monit., 2007 | DOI: 10.1039/b610737k | Paper

Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

Magali Deloge-Abarkan[a], Thi-Lan Ha[b], Enric Robine[b], Denis Zmirou-Navier[a] and Laurence Mathieu*[c]
[a]*Département Environnement et Santé Publique, INSERM ERI no 11, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, F-54 505, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[b]*Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (C.S.T.B.), Laboratoire de Microbiologie des Environnements Intérieurs, 84 avenue Jean Jaurès, F-77 447, Marne la Vallée cedex 2, France*
[c]*Laboratoire d'Hydroclimatologie Santé Environnement, Ecole Pratique des Hautes Etudes, INSERM ERI no 11, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, F-54 505, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. E-mail: laurence.mathieu@medecine.uhp-nancy.fr; Fax: 33 383 683 489; Tel: 33 383 683 486*

Received 26th July 2006, Accepted 18th October 2006

First published on the web 10th November 2006

Aerosols of water contaminated with *Legionella* bacteria constitute the only mode of exposure for humans. However, the prevention strategy against this pathogenic bacteria risk is managed through the survey of water contamination. No relationship linked the *Legionella* bacteria water concentration and their airborne abundance. Therefore, new approaches in the field of the metrological aspects of *Legionella* bioaerosols are required. This study was aimed at testing the main principles for bioaerosol collection (solid impaction, liquid impingement and filtration) and the *in situ* hybridization (FISH) method, both in laboratory and field assays, with the intention of applying such methodologies for airborne *Legionella* bacteria detection while showering. An aerosolization chamber was developed to generate controlled and reproducible *L. pneumophila* aerosols. This tool allowed the identification of the liquid impingement method as the most appropriate one for collecting airborne *Legionella* bacteria. The culturable fraction of airborne *L. pneumophila* recovered with the liquid impingement principle was 4 and 700 times higher compared to the impaction and filtration techniques, respectively. Moreover, the concentrations of airborne *L. pneumophila* in the impinger fluid were on average 7.0×10^5 FISH-cells m^{-3} air with the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method *versus* 9.0×10^4 CFU m^{-3} air with the culture method. These results, recorded under well-controlled conditions, were confirmed during the field experiments performed on aerosols generated by hot water showers in health institutions. This new approach may provide a more accurate characterization of aerobiocontamination by *Legionella* bacteria.

Introduction

First described in 1977,[1] *Legionella* bacteria are still of topical interest, and constitute a significant problem of public health. The main mode of transmission of *Legionella* bacteria is inhalation of a contaminated aerosol produced by colonized hydrous sources. Exposure to *Legionella* sp., bacteria naturally found in hydrous and humid environments, is increasing because of the number of man-made habitats (air conditioning systems, cooling towers, whirlpools, spas, fountains, dental devices, shower heads), all potentially producing aerosols.[2–7] Such multiplication of artificial hydrous environments can involve epidemics of legionellosis.[8–10]

Thus, in France, the management of the risk associated with *Legionella* bacteria consists of preventing microbial proliferation, and keeping concentrations below the lawful threshold, fixed at 10^3 CFU l^{-1} for hot water networks.[11] This approach is unreliable due to the underestimation of the culture-based method because of the presence of viable/active but non-culturable bacteria, and *Legionella* bacteria within biofilms or intra-amoebas that are not accessible with the standardized cultural technique. Moreover, culture analysis is time-consuming and could be affected by stresses arising during aerosolization of microorganisms which could lead

to a loss of their culturability.[3,12] Even if some old works have focused on detecting airborne *Legionella*,[4,8,12-17] any relationship between the *Legionella* concentration present in water and bacteria dispersed into aerosols has not yet been established. It is therefore difficult to assess the *Legionella* bacteria health risk based only on water measurements. To have a more representative exposure assessment, it would be helpful to determine airborne *Legionella* bacteria generated from suspicious aquatic environments.

Our objective was to perform an environmental study on the feasibility of the detection of airborne *Legionella* bacteria while showering in two health care centres in northern France. This monitoring needed efficient sampling and adequate methods for analysis. So, a first step, performed in the laboratory with controlled *Legionella* bacteria aerosols, aimed to identify the methodologies to be used, by testing: (i) three principles of bioaerosol collection (solid impaction, liquid impingement and filtration) to evaluate their influence on the culturability of aerosolized *Legionella*, and (ii) the *in situ* hybridization (FISH) method to detect airborne *Legionella* bacteria.

In the second part of the study, field trials were performed in two health institutions chosen because of their recurrent problems with water *Legionella* spp. contamination. These field trials have enabled us to appreciate: (i) the abundance of airborne *Legionella* bacteria generated by hot-water showers, and (ii) the relevance of the aerosol's collection principles and the analytical methods for airborne *Legionella* spp. detection.

Material and methods

Laboratory trials

Inoculum preparation for aerosolization procedure. *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain (ATTC 33 152) was used in the laboratory to evaluate detection methods for airborne *Legionella* bacteria. Before each use, a stock suspension stored at −20 °C was subcultured on the specific agar for *Legionella* spp. detection [buffered charcoal yeast extract agar supplemented with α-ketoglutarate (BCYEα)] for three days at 37 °C (±1 °C).

To perform the aerosolization procedure, *L. pneumophila* colonies were harvested and grown in a specific nutrient broth (ACES buffer 6.0 g l^{-1}, α-ketoglutarate 1.0 g l^{-1}, brain heart 11.5 g l^{-1}, L-cysteine 0.4 g l^{-1}, ferric pyrophosphate 0.25 g l^{-1}, deionized water, pH = 6.8–7.0) at 37 °C (±1 °C).

After 2 days' incubation, bacterial cells were further harvested and were washed three times by centrifugation at $8 \times 10^2 g$ for 20 min (model EBA 8S, Hettich) in sterile deionized water, also used as diluent for the aerolization suspension. Deionized water was preferred to a buffer solution because salts were expected to affect the microbial viability and the results obtained with the optical particle counter. Bacterial density was determined by turbidity using a spectrometer (model HI 93703, HANNA Instruments) calibrated with a standard of Formazine Turbidity Unit tubes.

Test system. The experimental setup shown schematically in Fig. 1 was developed to evaluate bioaerosol sampling techniques. The system was housed into a class III biological safety zone. Aerosolized *L. pneumophila* was produced from the bacterial suspension, using a bubbling generator we have developed and adapted from Ulevicius *et al.*[18] The aerosol was then stored in a chamber (volume, 3 dm^3) where its concentration and size were checked with an optical particle counter (model 1.105, Grimm Aerosol Technik GmbH). During the course of tests, temperature was maintained at 20 °C (±1 °C) and relative humidity ranged from 30–35%.

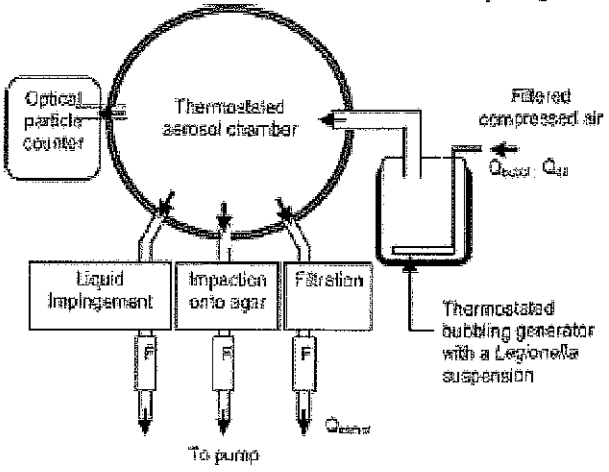


Fig. 1 Schematic representation of the laboratory experimental setup (F: flowmeter; Q_{bubbl}: bubbling airflow; Q_{dil}: dilution airflow; Q_{sampl}: sampling airflow).

In order to assess the methodologies to be used, the bioaerosol generated during the laboratory trials was sampled using three collection principles: (i) impaction onto agar (Andersen sampler; cut-off diameter: 0.65 µm; flow rate: 28.3 l min^{-1}; sampling volume: 8.5 l of air; collection medium: BCYEα); (ii) impingement into liquid (SKC Biosampler (Arelco); cut-off diameter: 0.3 µm; flow rate: 12.5 l min^{-1}; sampling volume: 125 l of air; collection medium: sterile distilled water); and (iii) filtration (collectron MD8 (Sartorius), cut-off diameter: >0.5 µm; flow rate: 10 l min^{-1}; sampling volume: 10 l of air; collection medium: 0.8 µm pore-size nitrocellulose membrane). The impaction and liquid impingement methods remove particles from the airstream by utilizing their inertia to depose them onto an agar medium or into a liquid surface.[18] Filtration collects particles by inertial forces, interception and diffusion.[19]

In previous studies performed in this aerosolization chamber in controlled conditions (data not shown), the aerodynamic diameter of airborne *L. pneumophila* was evaluated at 0.9 µm, suggesting that all aerosolized cells will be sampled by the three methods used.

Three independent assays were conducted in the laboratory, for each sampling technique. The samples collected on BCYEα medium were kept at 37 °C (±1 °C). For the impinger fluid, aliquots (0.1 ml) of an appropriate ten-fold dilution were spread on BCYEα agar before incubation. After filtration sampling, the membrane was transferred aseptically to the Petri dish containing the BCYEα agar.

The bacterial recovery rate (R) was measured as the concentration of *L. pneumophila* in aerosols $(C_{part})_{AIR}$ (measured using the optical partile counter), relative to its culturable fraction $(C_{CFU})_{AIR}$, as following:

$$R = \frac{(C_{part})_{AIR}}{(C_{CFU})_{AIR}} \qquad (1)$$

In addition, to perform airborne *Legionella* bacteria detection, the impinger fluid was analyzed both with the culture method, as described above, and with the molecular hybridization method, described below.

Field investigation procedures

The environmental study, about the feasibility of airborne *Legionella* bacteria detection while showering, was performed in two health care centres in northern France, chosen because of their recurrent problems with water *Legionella* spp. contamination. Both hot water and bioaerosols were sampled as described in Fig. 2.

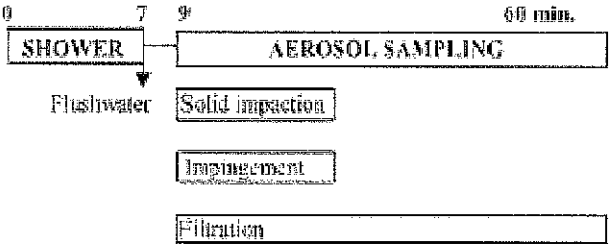


Fig. 2 Field sampling protocol.

Eighteen showers were sampled, with the hot water faucet opened to its maximum flow; the bathrooms' ventilation was systematically shut down and the doors and windows closed during the investigations.[20]

One litre of hot water, collected in sterile bottles, was systematically taken after about 7 min of water flushing (average duration of a shower[21]). The bioaerosol sampling began only after the faucet of hot water was closed, in order to prevent the sampling of water droplets. The bioaerosols were sampled using the same collection principles as in the laboratory experiments, except the air volume sampled which were higher than those used in laboratory assays with a pure strain of *L. pneumophila* at high concentration (~10^6 CFU l^{-1}). Field sampling characteristics are summarized in Table 1. During the sampling, the water and air temperatures and relative humidity (RH) (Testo 452, Testo) were monitored.

Table 1 Characteristics of bioaerosol sampling techniques used during the field investigations

Collection principles	Samplers and collection media	Flow rate/l min^{-1}	Sampled air volume/l
Impaction onto agar	MAS 100 (Merck); BCYEα agar	100	500
Liquid impingement	SKC Biosampler (Arelco); sterile distilled water	12.5	195
Filtration	Millipore cassette; 0.2 μm pore size polycarbonate membrane	10	600

The three principles of aerosol sampling were used simultaneously at a fixed point (oriented towards the shower at 80 cm height and at one metre in front of it), and started at the same time. Using solid impaction, the samples collected on the BCYEα agar medium were kept at 37 °C (±1 °C) (they permit solely the detection of the culturable *Legionella* spp). For the impinger and filtration methods, the samples were kept for *in situ* hybridization.

Determination of the culturable *Legionella* fraction

The detection of the culturable *Legionella* bacteria was adapted from the French standard method AFNOR,[22] using the selective nutrient agar BCYE (Buffer Charcoal Yeast Extract) (Oxoïd, UK). For laboratory assays, *L. pneumophila* colonies were enumerated after 7 days' incubation at 37 + 1 °C. For field assays, characteristic *Legionella* spp. colonies were counted and tested for their cysteine dependence (CD) by inoculation onto BCYE agar with cysteine (0.4 g l^{-1}) and without cysteine, and incubated for 48 h at 37 °C ± 1 °C. Colonies that grew on both media were considered CD negative and were reported as non-*Legionella* bacteria. Colonies that grew only on BCYE with cysteine (CD positive colonies) were identified as *Legionella* spp. The results were expressed in CFU l^{-1} of water or in CFU m^{-3} of air. The detection limit was 1.0×10^2 CFU l^{-1} water and 1.2×10^4 CFU m^{-3} air.

Application of the FISH technique for detection of airborne *Legionella bacteria*

The fluorescent *in situ* hybridization (FISH) protocol was performed as suggested by Manz *et al.*[23] The oligonucleotide probe (Molecular Probes) LEG705 (5'CTGGTGTTCCTTCCGATC-3') specific for *Legionellaceae* 16S RNA and labeled with carbocyanine at the 5' end, was used to detect *Legionella* spp.[23,24] Each sample was filtered through 0.2 μm pore size white polycarbonate membrane (Millipore) and was fixed with 3.7% formaldehyde (vol/vol) for 30 min. The membrane was washed twice with phosphate-buffered saline (pH 7.4), air-dried and dehydrated with 2 ml of increasing concentrations of ethanol (50, 80, and 95%, 3 min each). Then 50 μl aliquot of hybridization solution (20% formamide, 900 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 20 mM Tris-HCl [pH 7.2]), containing 50 ng of the labeled probe, was applied to the membrane. Hybridization was performed for 2 h at 46 ± 1 °C in a moisture chamber. The filter was then washed twice with 46 °C preheated wash solution for 30 min (20 mM Tris-HCl, 215 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, [pH 7.2]), air dried and mounted on a slide with AF87 antifading reagent (Citifluor, Biovalley). Hybridized bacterial cells were visualized by epifluorescence microscopy with an X100 immersion objective lens and a 510 to 550 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. Thirty microscopic fields were counted, and the results were expressed in *Legionella*-cells m^{-3} of air or *Legionella*-cells l^{-1} of water. The hybridization procedure quality was checked systematically by using species known to hybridize (or not) with the LEG705 probe.

Determination of the total cell counts in hot water samples

The total number of bacteria in water samples was determined with the DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining, using the protocol described by Šaby *et al.*[25] The water samples were filtered through 0.2 μm pore size black polycarbonate membranes (Millipore) and were overlaid with 3 ml of a 0.5 μg ml^{-1} DAPI solution for 15 min. After washing with sterile distilled water, the membranes were air dried, then mounted on a slide with AF87 antifading reagent (Citifluor, Biovalley). The fluorescence microscopy conditions were the same as described for the FISH method, except that the filter sets were appropriate for DAPI staining detection. Thirty randomly chosen microscopic fields were counted for each water sample. The results were expressed in bacterial

cells l^{-1} of water. The detection limit was 6.7×10^4 bacterial cells l^{-1} for 20 ml of water analyzed.

Statistical analysis

All data are analyzed with the program Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). The Mann–Whitney rank sum test was used to assess the association between *Legionella* bacteria detection by the culture method and by the FISH method.

Results

Laboratory experiments

Impact of sampling method on cultivability of airborne *Legionella*. The impact of biocollection method on the ability of aerosolized *Legionella* bacteria to grow on medium agar was measured as a bacterial recovery rate (eqn (1)). Results are shown in Fig. 3 according to the three tested collection methods. Under our experimental laboratory conditions, one *L. pneumophila* colony forming unit (CFU) among 10 airborne particles was detected by liquid impingement. Conversely, for impaction onto agar and filtration, respectively, 40 and 7×10^3 aerosolized *Legionella pneumophila* were necessary to detect 1 colony of culturable (CFU) *L. pneumophila*. The sampling stress appeared to be lower for the impingement technique, suggesting it would be more suitable for recovery of environmental *Legionella* bacteria aerosols.

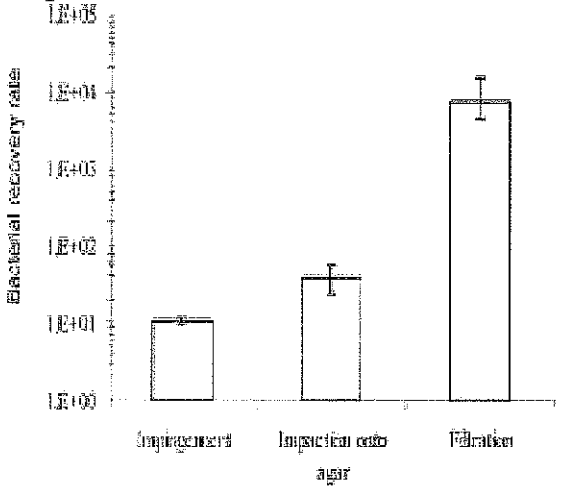


Fig. 3 Bacterial recovery rates between average *L. pneumophila* concentrations in the aerosol and their culturable fraction, according to the three collection methods used in the laboratory trials—the bars correspond to the minimal and maximal values ($n = 3$).

Application of the FISH protocol for *Legionella* detection in aerosols. To perform airborne *Legionella* bacteria detection, the potential of the FISH method was investigated. *L. pneumophila* aerosols were collected by liquid impingement and analyzed both with culture and FISH methods. The *L. pneumophila* concentration was measured at 9×10^4 CFU m^{-3} of air and 7×10^3 *Legionella*-cells m^{-3} of air (Fig. 4). A significant detection of 74% of aerosolized *L. pneumophila* was then measured with the molecular method, *versus* 12% with the culture analysis.

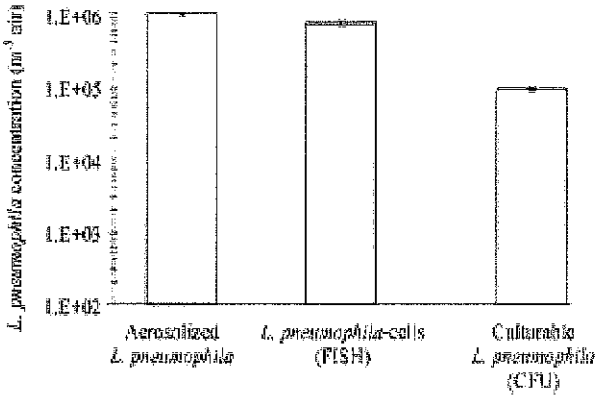


Fig. 4 Concentrations of aerosolized *L. pneumophila* in the aerosol chamber (expressed as particles m^{-3}) and after collection using impingement and detection by FISH and culture methods during the laboratory trials—the bars correspond to the standard deviation ($n = 3$).

Detection of *Legionella* in field samples

Water sampling characterization. The hot water characteristics are presented in Table 2. It contained on average from 4.3×10^7 to 1.8×10^8 total bacterial cells l^{-1} (DAPI staining). All the hot water shower samples were contaminated by *Legionella* spp. The FISH method permitted a significantly higher detection of this pathogenic bacteria than culture (Mann–Whitney test, $p < 0.01$): hybridized *Legionella* population account for 2.0% of the total bacteria in the hot water shower *versus* only 0.17% for the culturable fraction. Under our experimental conditions, one *Legionella* spp. among 10^2 total bacteria l^{-1} of hot water was detected by the FISH method, while more than 10^3 total bacteria l^{-1} in hot water were necessary to detect one *Legionella* spp. by the culture method.

Table 2 Microbial and physical characteristics of the hot water and ambiance conditions during the bioaerosol shower samplings ($n = 18$)

	Hot water shower temperature/°C[a]	Culturable *Legionella* spp./CFU l^{-1}	Hybridized *Legionella* spp./cells l^{-1}	Total bacteria/cells l^{-1}	Relative humidity (%)	Air temperature/°C
Positive samples (%)	—	18/18 (100)	18/18 (100)	18/18 (100)	—	—
Average value	37.4[b]	4.03×10^4[c]	4.65×10^5[c]	9.69×10^7[c]	89.3[b]	25.0[b]
Standard deviation	3.7	1.92×10^5	1.11×10^6	4.10×10^7	12.3	1.9
Minimum	27.0	6.70×10^3	3.60×10^4	4.33×10^7	64.2	21.8
Maximum	41.0	5.00×10^5	3.53×10^6	1.80×10^8	99.9	28.2

[a] Monitored during shower (from 3.5 to 7 min). [b] Arithmetic mean. [c] Geometric mean.

Airborne *Legionella* detection in hot water shower aerosols. Whereas 100% of the water samples contained culturable *Legionella* spp., none could be detected in 83% of the aerosol samples using agar impaction. Only three aerosols were positive, with only one colony of *Legionella* spp. detected, corresponding to 2 CFU m^{-3} air.

To perform airborne *Legionella* bacteria detection, impinger fluids and the membranes used for filtration were analyzed with the FISH method (Fig. 5). Hybridized *Legionella* spp. were detected in 50% and in 72.2% of the aerosol samples with filtration and impingement, respectively. The liquid impingement method allowed a significantly higher detection of airborne *Legionella* bacteria (on average 2.71×10^5 *Legionella*-cells m^{-3} air)

than filtration (on average 1.4×10^1 *Legionella*-cells m^{-3} air). Filtration appeared to be harmful to airborne *Legionella* bacteria, unlike impingement.

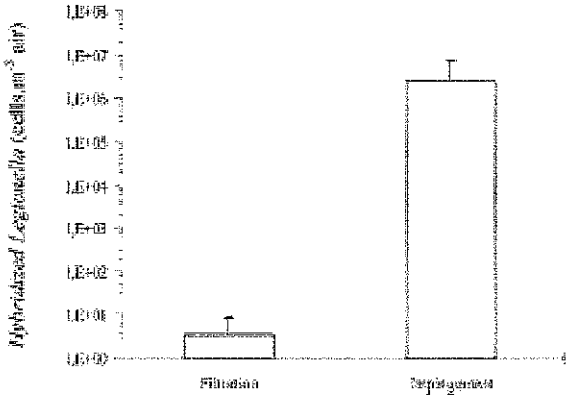


Fig. 5 Hybridized *Legionella* spp. concentrations (FISH method) in hot water shower aerosols according to the collection method—the bars correspond to the standard deviation ($n = 18$).

Discussion

In this study, we attempted to characterize the airborne *Legionella* contamination while showering by testing (i) the three main principles adapted for bioaerosol sampling (impaction on solid medium, liquid impingement and filtration) and (ii) the FISH method for *Legionella* spp. detection in aerosols. Two sets of experiments were performed: laboratory assays in controlled conditions using an aerosolization chamber, and in field conditions with contaminated showers in two health institutions.

Performance of sampling methods for airborne *Legionella* detection

A number of studies with contradictory findings have been published about the samplers' performance, both under laboratory and field settings[26–28] for detection of fungi, or total or culturable heterotrophic airborne bacteria. The performance of these biocollection methods has previously been reported in few studies but using the culture method for bacterial detection. They showed that impingement can detect more bacteria than agar impaction[6,15,29] or than filtration.[30]

Using controlled, well-characterized and reproducible *L. pneumophila* aerosols generated in an aerosolization chamber,[31] our results, specifically dedicated to airborne *Legionella* collection, showed that the impingement technique improved the aerosolized *Legionella* bacteria detection, measured through their culturability, by 4 to 700 times compared to impaction and filtration, respectively.

This is in agreement with the study of Ishimatsu *et al.*,[6] where impingement technique also improved the culturability of aerosolized *Legionella pneumophila* detection, by 2 to 20 times compared to impaction.

This difference of samplers' performance could be explained by their design and physical performances. It is generally assumed that all microorganisms above the particle cut-size are collected and an impinger might be more efficient in collecting small bioaerosol particles compared to impaction and filtration.[26,32] It should be noted that the evaluation of bioaerosol sampling performance includes inevitably the combined effects of three factors: aerosolization, collection and environment. Wang *et al.*[33] estimated that the aerosolization and collection by filtration accounted for more than 40% of the culturability loss of bacterial cells: the process of aerosolization, in addition to killing a large number of vegetative cells, causes damage to the cell envelope.[34] For Hambleton *et al.*,[16] this evaluation may be affected by the composition of the spray and collecting fluids: an aerosolized *L. pneumophila* strain was tolerant of distilled water and Page's saline. The effects of spray fluid additives and of collecting fluids were not investigate here, but we have studied the survival in the best conditions, which achieved 80% of aerosolized *Legionella pneumophila* with an intact membrane (*Bac*light kit, data not shown).

Another factor could also explain the differences between the airborne *Legionella* bacteria recoveries: the medium onto which bioaerosol particles were collected (filter, agar or liquid).

During bioaerosol collection, microbial stress is influenced by the medium used for their recovery.[35–37] For collecting fluids, Ishimatsu *et al.*[5] reported, for instance, that a BYE broth allowed better trapping and survival

rates of *Legionella pneumophila* compared to Page's saline and 2% yeast extract solution. For Stewart *et al.*,[37] microbial injuries occurred during impaction on solid media, thus preventing the culturability of airborne bacteria. For aerosol collection onto filter, Li and Lin[38] showed that the relative survival of *E. coli* collected by filtration was lower than that observed when collected by impingement, presumably because of the dryness of the agar plate or filter during the sampling time.[39] Indeed, desiccation stress is of great importance when collecting bioaerosols[3,12] and microorganisms do fail to grow when the collection support dries out.[40,41] In this study, the liquid impingement method is a relevant tool for *Legionella* bacteria detection, by culture and FISH methods.

Application of the FISH method for airborne *Legionella* detection

Culture-based approaches are commonly used to detect and characterize biological particles of aerosols. Even if culture is the standard conventionnal method for environmental samples, numbers of studies have proved that it underestimates the real number of viable microorganisms in environments,[34,42–45] including aerosols.[46–47] Several authors reported detection of non-culturable environmental bacteria by non-conventional techniques.[44,48–49] Nyström[50] reported the unculturability of *Legionella* bacteria from water samples but also confirmed the presence of viable *L. pneumophila* after guinea pig inoculation.

These low culturability of environmental bacteria, and especially of airborne microorganisms, require usage of alternative methods such as molecular techniques, in combination with culture-based techniques.[51] Thus, studies using PCR-based methods are widespread for aerosolized *Legionella* detection[8,13,52,53] and to our knowledge, only one study was performed using *in situ* hybridization (FISH) to detect airborne bacteria,[54] and none for aerosolized *Legionella* bacteria detection.

In the laboratory, as in the field assays, our results showed that airborne *Legionella* spp. could be detected with FISH whereas a low fraction or none was culturable, which is in agreement with the recent work done during the Pas-de-Calais Legionnaires' Disease outbreak.[55] Thereby a fraction of *Legionella* bacteria has already lost its culturability while its remains physiologically active. This suggests the existence of bacteria which have enough intact rRNA to be detected by FISH, but which are not able to replicate on agar medium within 10 days. This lead to the concept of active non-culturable bacteria (ANC) developed by Lebaron *et al.*[49] for the hydrous environment. It could be considered that bacterial detection with oligonucleotide probes may be related to their physiological states, which is dependent on their growth rate,[56,57] and to their rRNA content,[54,58,59,60] as already shown with environmental samples.[60,61] Therefore FISH might yield useful information on the bacterial physiology even if it is not considered as a viability marker.[62,63]

In our experimental conditions, the FISH method is suitable for aerosolized *Legionella* spp. detection without any cultivation[64] or selective purification or amplification steps.[45] The analysis can be performed within 12 h, as against 7 to 10 days for the culture method. Because of the utilization of a nucleic probe targetted at *Legionella* spp., FISH is a specific method which allows the identification of nonculturable *Legionella* bacteria among the environment's bacterial populations. The FISH method could be therefore considered as a relevant tool for auto-controls and rapid monitoring of installations at risk (cooling tower, hot water supply network...), as well as the PCR, with therefore the advantage of results expressed in numbers of *Legionella* bacterial cells. This point is particularly important with respect to risk management, which can then be done almost in real time and not *a posteriori*, as it is currently the case.

Some improvement could be realized, in particular combining the FISH method with a viability measurement, which is not used today, neither for airborne bacteria in general, nor for *Legionella* bacteria. In the future, the application of image analysis could enhance the hybridized *Legionella* bacteria detection, making it less fastidious.

Conclusions

Our objective was to perform an environmental study on the feasibility of the *Legionella* bacteria detection while showering, using the three main principles of bioaerosol collection. The liquid impingement technique has been identified as the most appropriate method for collecting airborne *Legionella* in well-controlled conditions (aerosolization chamber) and during the field experiments (hot water shower aerosols). Moreover, this study showed an improved assessment of airborne *Legionella* bacteria using the impingement technique combined with the FISH detection method. It may provide a more accurate characterization of aerobiocontamination by this pathogenic bacteria.

Acknowledgements

This research was supported by the Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale (AFSSE), Veolia Environment and the Direction Générale de la Santé (DGS). This work was sponsored in part by the French Agency for Environment and Energy Management (ADEME) and Electricité de France (EDF).

References

1 J. E. McDade, C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus and W. R. Dowdle, *N. Engl. J. Med.*, 1977, **297**, 1197–1203 [Links].

2 R. S. Bhopal, *J. Public Health Med.*, 1991, **13**, 281–289.

3 G. E. Bollin, J. F. Plouffe, M. F. Para and B. Hackman, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **50**, 1128–1131 [Links].

4 P. J. L. Dennis, A. E. Wright, D. A. Rutter, J. E. Death and B. P. C. Jones, *J. Hyg.*, 1984, **93**, 349–353.

5 M. Hodgson and B. J. Casey, http://www.claytongrp.com/legion_art.html, 1998.

6 S. Ishimatsu, H. Miyamoto, H. Hori, I. Tanaka and S. I. Yoshida, *Ann. Occup. Hyg.*, 2001, **45**, 421–427 [Links].

7 D. W. Keller, R. Hajjeh, A. DeMaria, B. S. Fields, J. M. Pruckler, R. S. Benson, P. E. Khudt, S. M. Lett, L. A. Mermel, C. Giorgio and R. F. Breiman, *Clin. Infect. Dis.*, 1996, **22**, 257–261 [Links].

8 Centers for Disease Control and Prevention, *Morbidity Mortality Wkly. Rep.*, 2005, **54**, 165–168.

9 C. A. Joseph, *Epidemiol. Infect.*, 2004, **132**, 417–424.

10 T. M. N. Nguyen, D. Ilef, S. Jarraud, L. Rouil, C. Campese, D. Che, S. Haeghebaert, F. Ganiayre, F. Marcel, J. Etienne and J. C. Desenclos, *J. Infect. Dis.*, 2006, **193**, 102–111 [Links].

11 *Le Risque Lié aux Légionelles, Guide d'Investigation et d'Aide à la Gestion*, Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF), Paris, 2005.

12 B. Z. Predicala, J. E. Urban, R. G. Maghirang, S. B. Jerez and R. D. Goodband, *Curr. Microbiol.*, 2002, **44**, 136–140 [Links].

13 A. J. Alvarez, M. P. Buttner, G. A. Toranzos, E. A. Dvorsky, A. Toro, T. B. Heikes, L. E. Mertikas-Pifer and L. D. Stetzenbach, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 374–376 [Links].

14 R. F. Berendt, H. W. Young, R. G. Allen and G. L. Knutsen, *J. Infect. Dis.*, 1980, **141**, 186–192 [Links].

15 P. J. Dennis and J. V. Lee, *J. Appl. Bacteriol.*, 1988, **65**, 135–141 [Links].

16 P. Hambleton, M. G. Broster, P. J. Dennis, R. Henstridge, R. Fitzgeorge and J. W. Conlan, *J. Hyg.*, 1983, **90**, 451–460.

17 L. Pascual, S. Perez-Luz, A. Amo, C. Moreno, D. Apraiz and V. Catalan, *Can. J. Microbiol.*, 2001, **47**, 341–347 [Links].

18 V. Ulevicius, K. Willeke, S. A. Grinshpun, L. Donnelly, X. Lin and G. Mainelis, *Aerosol Sci. Technol.*, 1997, **26**, 175–190 [Links].

19 P. A. Jensen, B. Lighthart, A. J. Mohr and B. T. Shaffer, in *Atmospheric Microbial Aerosols Theory and Applications*, ed. B. Lighthart and A. J. Mohr, Chapman and Hall Inc., New York, 1994, pp. 226–284.

20 B. Marshall, P. Flynn, D. Kamely and S. B. Levy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**, 1776–1783 [Links].

21 United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), *Exposure Factors Handbook*, U.S. EPA, Washington, DC, 1997.

22 Association Française de Normalisation, *Norme AFNOR T90-431*, Association Française de Normalisation, Paris, France, 2003.

23 W. Manz, R. Amann, R. Szewzyk, U. Szewzyk, T. A. Stremström, P. Hutzler and K. H. Schleifer, *Microbiology*, 1995, **141**, 29–39 [Links].

24 R. I. Amann, W. Ludwig and K. H. Schleifer, *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**, 143–169 [Links].

25 S. Saby, I. Sibille, L. Mathieu, J. L. Paquin and J. C. Block, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 1564–1569 [Links].

26 P. A. Jensen and M. P. Schafer, in *NIOSH Manual of Analytical Methods*, 1998, ch. J, pp. 82–112.

27 S. K. Mehta, D. M. Robinson, T. O. Groves, L. D. Stetzenbach and D. L. Pierson, *AIHA J.*, 2000, **61**, 850–854.

28 S. D. Pillai and S. C. Ricke, *Can. J. Microbiol.*, 2002, **48**, 681–696 [Links].

29 L. L. Lembke, R. N. Kniseley, R. C. Van Nostrand and M. D. Hale, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1981, **42**,

222–225 [Links].

30 C. Duchaine, P. S. Thorne, A. Meriaux, Y. Grimard, P. Whitten and Y. Cormier, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 2775–2780 [Links].

31 T. L. Ha, M. Deloge-Abarkan, L. Mathieu and E. Robine, Metrology of Legionella aerosols: from a laboratory approach to a field evaluation of sampling and detection methods, *6th International Conference on Legionella, Chicago, IL, USA, 16th–20th October 2005*, American Society for Microbiology, board 36, p. 87, ISBN 1-555-81-367-4.

32 S. Terzieva, J. Donnelly, V. Ulevicius, S. A. Grinshpun, K. Willeke, G. N. Stelma and K. P. Brenner, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 2264–2272 [Links].

33 Z. Wang, T. Reponen, S. A. Grinshpun, R. L. Gorny and K. Willeke, *J. Aerosol Sci.*, 2001, **32**, 661–674 [Links].

34 L. A. White, D. J. Hadley, D. E. Davids and R. Naylor, *Appl. Microbiol.*, 1975, **29**, 335–339.

35 M. P. Buttner and L. D. Stetzenbach, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**, 1268–1270.

36 B. Marthi, V. P. Fieland, M. Walter and R. J. Seidler, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 3463–3467 [Links].

37 S. L. Stewart, S. A. Grinshpun, K. Willeke, S. Terzieva, V. Ulevicius and J. Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 1232–1239 [Links].

38 C. S. Li and Y. C. Lin, *Aerosol Sci. Technol.*, 1999, **30**, 280–287 [Links].

39 K. T. Durand, M. L. Muilenberg, H. A. Burge and N. S. Seixas, *Ann. Occup. Hyg.*, 2002, **46**, 113–118 [Links].

40 G. Blomquist, G. Strom and L. H. Stromquist, *Scand. J. Work Environ. Health*, 1984, **10**, 109–113.

41 K. Heldal, A. Skogstad and W. Eduard, *Ann. Occup. Hyg.*, 1996, **40**, 437–447 [Links].

42 J. J. Byrd, H. S. Xu and R. R. Colwell, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**, 875–878 [Links].

43 R. R. Colwell, *J. Infect. Chemother.*, 2000, **6**, 121–125 [Links].

44 D. Hussong, R. R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A. D. Pearson, R. M. Weiner and W. D. Burge, *Bio/Technology*, 1987, **5**, 947–950.

45 A. Moter and U. B. Göbel, *J. Microbiol. Methods*, 2000, **41**, 85–112 [Links].

46 W. D. Griffiths, I. W. Stewart, A. R. Reading and S. J. Futter, *J. Aerosol Sci.*, 1996, **27**, 803–820 [Links].

47 J. F. Heidelberg, M. Shahamat, M. Levin, I. Rahman, G. Stelma, C. Grim and R. R. Colwell, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 3585–3588 [Links].

48 F. Joux and P. Lebaron, *Microbes Infect.*, 2000, **2**, 1523–1535 [Links].

49 P. Lebaron, P. Servais, H. Agogué, C. Courties and F. Joux, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 1775–1782 [Links].

50 T. Nyström, *Arch. Microbiol.*, 2001, **176**, 159–164 [Links].

51 T. Paez-Rubio, E. Viau, S. Romero-Hernandez and J. Peccia, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 804–810 [Links].

52 P. Declerck, L. Verelst, L. Duviver, A. Van Damme and F. Ollevier, *Water Sci. Technol.*, 2003, **47**, 143–146.

53 H. Miyamoto, H. Yamamoto, K. Arima, J. Fujii, K. Maruta, K. Izu, T. Shiomori and S. Yoshida, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 2489–2494 [Links].

54 J. L. Lange, P. S. Thorne and N. Lynch, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 1557–1563 [Links].

55 L. Mathieu, E. Robine, M. Deloge-Abarkan, S. Ritoux, D. Pauly, P. Hartemann and D. Zmirou-Navier, *J. Infect. Dis.*, 2006, **193**, 1333–1335 [Links].

56 F. Fegatella, J. Lim, S. Kjelleberg and R. Cavicchioli, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 4433–4438 [Links].

57 L. Kerkhof and P. Kemp, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, **30**, 253–260 [Links].

58 E. F. DeLong, G. S. Wickham and N. R. Pace, *Science*, 1989, **243**, 1360–1363 [Links].

59 P. F. Kemp, S. Lee and J. Laroche, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 2594–2601 [Links].

60 L. K. Poulsen, G. Ballard and D. A. Stahl, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 1354–1360 [Links].

61 C. Ramos, L. Molbak and S. Molin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 801–809 [Links].

62 J. L. McKillip, L. A. Jaykus and M. Drake, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 4264–4268 [Links].

63 A. Villarino, O. Bouvet, B. Regnault, S. Delautre and P. A. Grimont, *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, 55, 245–247 [Links].

64 B. Wullings, R. Voogt, H. Veenendaal and D. Van der Kooij, in *Legionella*, ed. R. Marre, Y. Abu Kwaik, C. Bartlett, N. P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker and P. C. Lück, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 2002, pp. 263–266.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2006

3 CONTAMINATION DES AEROSOLS PAR *LEGIONELLA*

3.1 SITES DE PRELEVEMENTS DES MAISONS DE RETRAITE

La répartition de l'ensemble des sites de prélèvements concernés par l'étude a été présentée dans le chapitre précédent (Figure 3.1).

Les prélèvements ont été effectués au niveau des douches utilisées par les résidents des maisons de retraite de Lorraine : il s'agit d'un prélèvement d'eau chaude et d'un prélèvement d'aérosol réalisés le même jour et de façon successive.

La détection des Légionelles a été effectuée par la méthode de référence, la culture sur gélose et par une nouvelle approche, l'hybridation *in situ* (FISH). Ces prélèvements ont été réalisés dans 34 établissements de santé d'Octobre 2003 à Novembre 2005 et les conditions sont présentées ci-après.

3.2 CONDITIONS DE PRELEVEMENT DE L'AEROSOL DE DOUCHES

La totalité des prélèvements d'aérosols a été réalisée dans des salles de bains (individuelles ou communes) des maisons de retraite disposant d'une douche équipée d'un pommeau, générateur d'un aérosol. Après installation des équipements nécessaires à la réalisation des prélèvements, les fenêtres et les portes étaient fermées et les systèmes de ventilation de la pièce étaient arrêtés dans la mesure du possible.

La douche est mise en fonctionnement à débit et température maximum pendant 7 minutes en direction d'un mannequin « brise-jet ».

Deux prélèvements d'eau sont réalisés à chaque point de douche étudié. Un premier prélèvement d'eau est effectué dès la mise en fonctionnement de la douche, il correspond au « 1er jet ». Ce premier prélèvement, fait sans flambage, à pression et température d'eau chaude maximum, est d'environ 300 mL : il correspond à la vidange du piquage de canalisation qui alimente le robinet. Après 3 minutes, le débit d'écoulement de l'eau est mesuré (rapport du volume d'eau exactement mesuré et du temps). Au terme de l'écoulement de la douche [EPA, 1997], un deuxième prélèvement d'eau dit « purge » est réalisé. Ces deux échantillons d'eau sont analysés de manière concomitante par la méthode de culture [AFNOR, 2003] et par la technique d'hybridation *in situ,* comme spécifié dans le chapitre 2, §6. Toutefois, l'aérosol est créé principalement par l'eau de purge pendant la durée de sa douche. De ce fait, seules les données d'eau de purge seront analysées dans la suite de ce chapitre.

Après un temps de repos de 1 à 2 minutes (afin d'échantillonner les aérosols et non les gouttelettes d'eau), deux types de biocollecteurs sont mis en route en même temps : il s'agit d'un MAS 100® (50 puis 500 litres d'air prélevés) et de deux impingers SKC (195 litres d'air prélevés chacun),

fonctionnant en parallèle. Chaque appareil est distant d'environ 30 cm. Les têtes de prélèvements des collecteurs sont orientées vers le pommeau de douche (Figure 4.1).

La température de la pièce ainsi que l'hygrométrie sont notées tout au long de la durée de la douche et des prélèvements d'air et ont été effectuées à l'aide d'un appareil Testomat (*Testo 452, France*).

Enfin, tous les appareils (biocollecteurs et sonde hygrométrique) sont situés sur une table de prélèvement à 80 cm du sol, le plus près possible de la cabine de douche et à l'abri des éclaboussures.

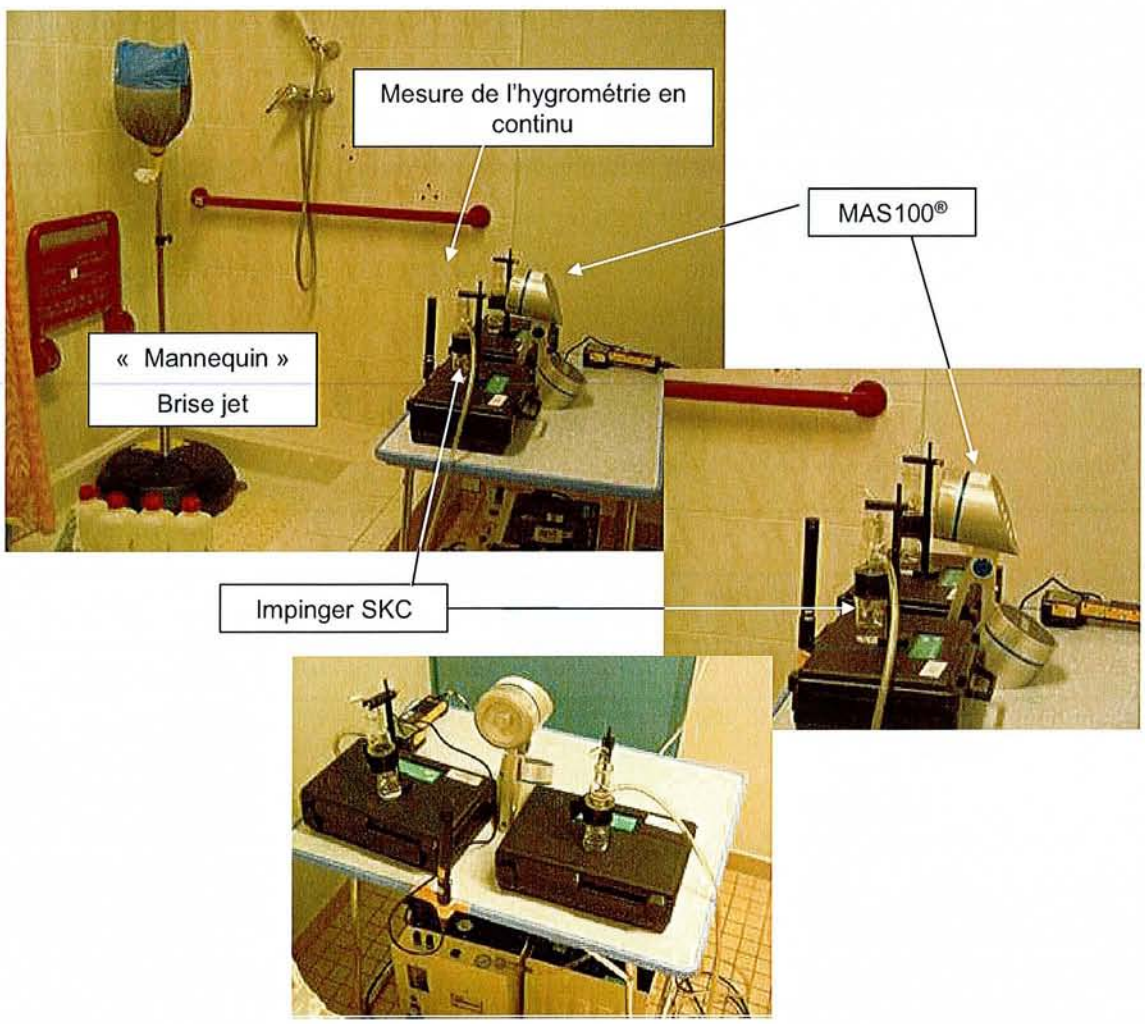


Figure 4. 1 : Mise en scène et positionnement des biocollecteurs lors des échantillonnages d'aérosol de douche.

3.3 PRESENTATION DES RESULTATS

Afin d'apprécier l'absence de contamination de l'air par des légionelles des espaces douches avant mise en fonctionnement des douches, huit prélèvements d'aérosols « témoins » ont été réalisés indépendamment les uns des autres, dans huit établissements, en s'assurant qu'aucune douche n'avait été prise depuis la veille au soir. Dans ces conditions d'essais, il s'est avéré qu'aucune légionelle cultivable n'a été détectée, quel que soit le biocollecteur utilisé. De même, aucune *Legionella* hybridée (FISH) n'a été détectée dans les échantillons collectés par impaction en milieu liquide, dans nos conditions d'expérimentation. Ces résultats obtenus avant douche laisse suggérer que la probable source de légionelles mesurées dans les aérosols est l'eau chaude contaminée de la douche.

Sur 164 prélèvements d'aérosols obtenus sur 34 sites (à la fois réalisés avec le MAS100® et l'impinger), seuls 5 points de prélèvement présentent des colonies de légionelles cultivables détectées à l'aide du MAS100® - pour 50 ou 500 litres d'air prélevés - alors qu'au même moment l'impinger SKC associé à l'analyse par hybridation *in situ* permet la détection de légionelles pour 47 (29%) prélèvements. Par ailleurs, aucune légionelle cultivable n'a été détectée avec l'impinger sur la totalité des prélèvements (Tableau 4.2).

Tableau 4. 2 : Caractéristiques microbiologiques de l'aérosol généré lors des douches dans les maisons de retraite.

	Impaction en milieu liquide			*Impaction sur milieu solide*
	Legionella cultivables (UFC.L^{-1} d'air)	***Legionella hybridées (Cellules.L^{-1} d'air)***	***Bactéries totales (Cellules.L^{-1} d'air)***	***Legionella cultivables (UFC.L^{-1} d'air)***
Echantillons positifs (%)	0/151 (0,0%)	47/164 (28,6%)	30/30 (100%)	5/164 (3,0%)
Moyenne géométrique [a]	_	$3,44 \times 10^{3}$	$1,61 \times 10^{5}$	$3,0 \times 10^{-3}$
Médiane [a]	_	$2,96 \times 10^{3}$	$8,46 \times 10^{4}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Concentration maximum [a]	_	$1,69 \times 10^{5}$	$5,68 \times 10^{6}$	$4,0 \times 10^{-2}$
Concentration minimum [a]		$4,61 \times 10^{2}$	$3,01 \times 10^{3}$	$1,0 \times 10^{-3}$

[a] calcul réalisé sur les échantillons positifs

La contamination de l'aérosol par *Legionella* détectée par la technique FISH varie de la limite détection ($3,0.10^{2}$ *Legionella* hybridées.L^{-1} air) à $1,7.10^{5}$ *Legionella* hybridées.L^{-1} air. La majorité (75%) des échantillons d'aérosols de douche contaminés présente une concentration en légionelles supérieure ou égale à 10^{3} *Legionella* hybridées.L^{-1} air (Figure 4.2).

Toutefois, la population de légionelles ne constitue qu'une faible proportion -0,003%- de la population bactérienne totale de l'aérosol (ratio FISH/ DAPI).

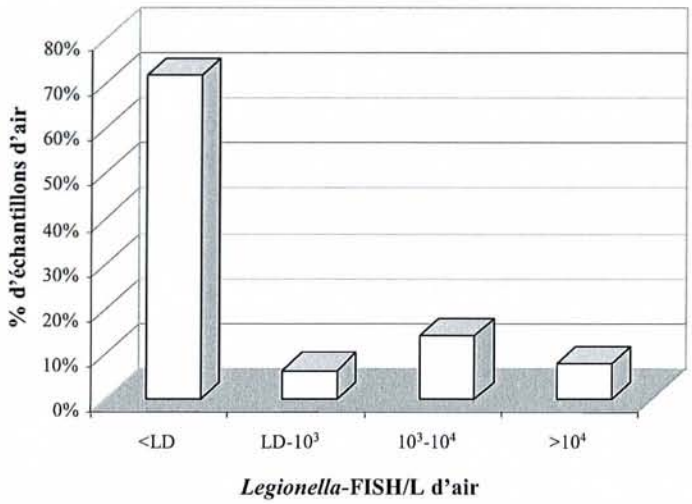


Figure 4. 2 : Classes de concentrations en Legionella, détectées par hybridation in situ, dans les aérosols de douche, collectés par impaction en milieu liquide (n=164).

3.4 PARAMETRES PHYSIQUES CARACTERISTIQUES DU PRELEVEMENT

Les prélèvements ont toujours été réalisés dans les mêmes conditions (§ 3.2 de ce chapitre), mais nous subissons des variations dues aux spécificités propres de chaque pièce (volume, température, ...). C'est pourquoi, il semblait nécessaire de caractériser l'ambiance de prélèvement qui peut influer d'une part sur le transfert des bactéries de l'eau à l'air et d'autre part sur la survie bactérienne dans l'air. Ceci nous a conduit à effectuer lors de chaque prélèvement aux différents points de douche des maisons de retraite, soit des mesures en continu, comme pour l'humidité relative et la température de la pièce, soit des relevés spécifiques à la pièce, comme son volume, soit encore des relevés spécifiques au point d'usage, comme le débit d'écoulement de l'eau.

Le tableau 4.3 illustre que tous les prélèvements d'aérosols ont été réalisés à une humidité relative supérieure à 90%, ce qui montre une saturation en eau de l'air. Cette forte teneur d'eau dans l'air est accompagnée par les températures ambiantes situées au-delà de 22°C.

Les débits d'écoulement de l'eau, intervenant dans les fonctions de transfert eau/air sont très variables (de 3,4 à 18,6 $L.min^{-1}$) car ils sont fonction de l'équilibrage du réseau d'eau général de chaque établissement.

Les prélèvements d'aérosols ont été effectués à la fois dans des salles de bain communes, spacieuses, ou dans une simple douche dans une chambre individuelle, plus modeste de taille, ce qui explique la grande amplitude des mesures pour les volumes de pièce (de 1,0 m^3 à 50,3 m^3).

Tableau 4. 3 : Caractéristiques physiques des ambiances de prélèvements des aérosols d'eaux chaudes générés lors des douches (n=164).

	Humidité relative (%) [1]	Température de l'air (°C) [1]	Débit d'écoulement d'eau (L/min)	Volume de l'espace douche (m^3)
Moyenne géométrique	90,88	26,4	9,9	12,0
Médiane	95,61	26,4	10,2	12,2
Valeur maximum	99,9	31,2	18,6	50,3
Valeur minimum	54,4	22,1	3,4	1,0

[1] Paramètres mesurés pendant le prélèvement d'aérosol, c'est-à-dire après l'écoulement d'eau de la douche.

4 RELATION ENTRE LA CONTAMINATION PAR *LEGIONELLA* DE L'EAU ET DES AEROSOLS DE DOUCHE

Les paragraphes suivants développent successivement (i) une première approche descriptive des résultats, avec une analyse en composante principale, et (ii) la relation entre les concentrations de *Legionella* dans l'eau et dans l'air, par notamment l'utilisation de régressions logistiques permettant de prédire la contamination en *Legionella* de l'aérosol.

L'objectif de cette partie est de tenter d'expliquer la présence de légionelles dans les aérosols au travers des facteurs environnementaux et des niveaux de concentrations en *Legionella* des eaux chaudes.

4.1 RESULTATS DE L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (ACP)

Une analyse en composante principale (ACP) a été employée dans une première approche afin de visualiser le maximum d'informations contenues dans la matrice de données, à savoir les liaisons entre les variables, leur répartition, leur poids ... . L'avantage de cette analyse est de pouvoir représenter graphiquement et de manière globale tous les résultats obtenus sans être obligé de traiter chaque variable mesurée l'une après l'autre. Néanmoins, ce type d'analyse statistique présenté ci-après reste purement descriptif.

L'ACP a été réalisée à partir des 122 observations complètes, sur les 164 au total, pour huit variables correspondant aux concentrations de *Legionella* détectées dans l'eau et dans l'aérosol de douche (par culture et hybridation *in situ*) ainsi qu'aux paramètres environnementaux de chaque point de prélèvement (débit d'écoulement d'eau, humidité relative, volume et température de la pièce). Les points de prélèvement pour lesquels toutes les variables n'ont pas pu être mesurées, notamment pour des valeurs de volume de pièce et de débit d'eau, ont été éliminés du traitement.
Le cercle des corrélations obtenu (Figure 4.3) présente dans un plan 1-2 chaque variable étudiée dont les coordonnées sont les coefficients de corrélation linéaire de cette variable avec chaque axe.

La représentation des huit variables selon les deux axes principaux permet d'expliquer 41,6% de la variation totale (24,9% pour l'axe 1 et 16,7% pour l'axe 2).

Certaines variables apparaissent bien représentées par le plan 1-2 puisqu'elles se situent à la périphérie du cercle. Il s'agit des variables des concentrations en légionelles détectées par FISH de l'eau chaude et de l'aérosol des douches (AIRFISHImpinger et FISHpurgeEAU) et de l'humidité relative où la somme des coefficients de corrélations de ces trois variables est comprise entre 64% et 69% (Tableau 4.4).

Par contre, les paramètres concernant le volume de la pièce, le débit d'eau et à la température ambiante sont moins bien représentés par le plan 1-2 puisque leur coefficient de détermination se situe entre 34 et 43%. Quant aux variables de la concentration en légionelles cultivables de l'eau chaude (UFCpurgeEAU) et de l'aérosol des douches (AIRMAS), elles sont médiocrement représentées voire pas représentées par ce système d'axes (ε (r^2) < 12 %).

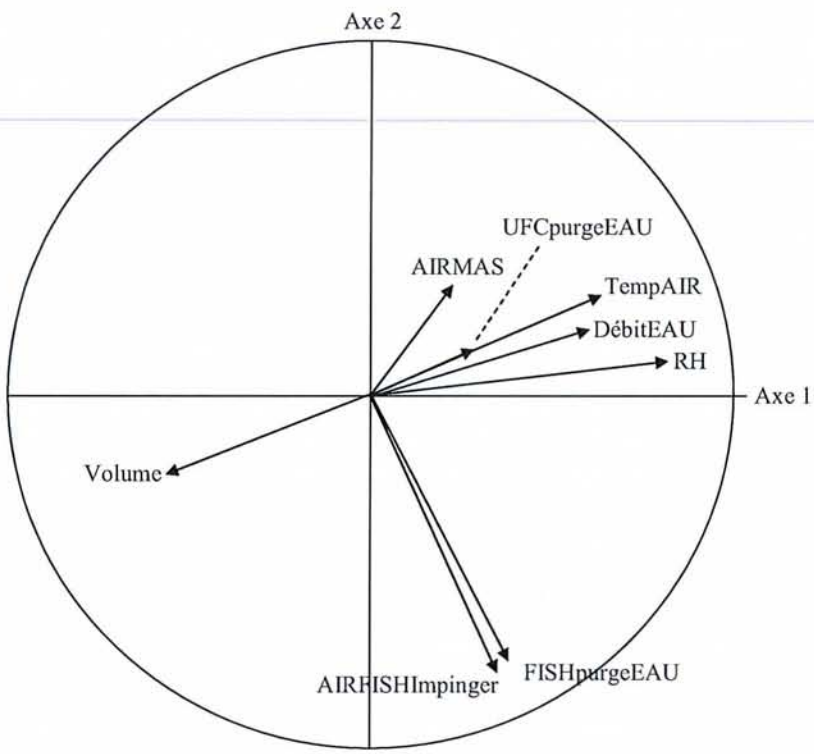


Figure 4. 3 : Cercle des corrélations des huit variables mesurées ; AIRMAS = concentration de Legionella cultivables de l'aérosol de douche collectées avec le MAS ; AIRFISHImpinger = concentration de Legionella hybridées (FISH) dans les aérosols collectées avec l'impinger; UFCpurgeEAU = concentration de Legionella cultivables dans l'eau chaude de purge ; FISHpurgeEAU = concentration de Legionella hybridées dans l'eau chaude de purge; volume = volume de la pièce ; DébitEAU = débit d'écoulement de l'eau ; RH = humidité relative ; TempAIR = température ambiante de la pièce.

Tableau 4. 4 : Coefficients de détermination entre les huit variables et les 2 axes principaux choisis.

VARIABLES	r^2		ε (r^2) en %
	Axe 1	Axe 2	
AIRMAS	0,045	0,074	11,9
AIRFISHImpinger	0,125	0,567	69,2
UFCpurgeEAU	0,055	0,009	6,4
FISHpurgeEAU	0,140	0,527	66,7
Volume	0,293	0,048	34,1
DébitEAU	0,335	0,034	36,9
RH	0,637	0,008	64,6
TempAIR	0,362	0,071	43,3

L'examen des corrélations entre les variables et les axes principaux permet d'estimer la part de variation expliquée par l'axe. Ainsi le tableau 4.4 suggère que l'axe 1 est majoritairement représenté par l'humidité relative (64%) ; l'axe 2 est expliqué par la concentration de légionelles détectées par FISH dans l'eau (53%) et dans l'aérosol (57%).

Ce système de représentation graphique selon un plan 1-2 permet d'affirmer le caractère faible de la relation entre d'une part les concentrations de légionelles détectées par FISH (dans l'eau et dans l'aérosol) et d'autre part les paramètres ambiants mesurés, et les concentrations en légionelles cultivables (dans l'eau et l'aérosol). Ceci est visible sur le cercle des corrélations (vecteurs orthogonaux) ainsi que par la faiblesse de leur corrélation (Tableau 4.5).

Tableau 4. 5 : Matrice de corrélation entre la concentration de Legionella mesurées dans l'eau chaude et dans l'aérosol de douches (culture et FISH) et les paramètres ambiants spécifiques de la pièce (significativité à 5% (--) ; n=122 ; $\alpha_{0,05}$ = 0,171).

	AIRMAS	AIRFISH impinger	UFCpurge EAU	FISHpurge EAU	Volume	Débit EAU	RH	Temp AIR
AIRMAS	1,000							
AIRFISHimpinger	-0,038	1,000						
UFCpurgeEAU	0,060	-0,030	1,000					
FISHpurgeEAU	-0,003	0,396	0,087	1,000				
Volume	-0,062	-0,018	-0,077	-0,063	1,000			
DébitEAU	0,169	0,075	0,133	0,065	-0,042	1,000		
RH	0,093	0,172	0,077	0,163	-0,379	0,362	1,000	
TempAIR	0,010	0,047	0,031	0,016	-0,250	0,242	0,363	1,000

En revanche, il est remarquable que les concentrations de légionelles détectées par FISH dans les eaux chaudes soient fortement corrélées à celles mesurées dans l'aérosol de douches. La proximité des points représentatifs des variables sur le cercle de corrélation en témoigne : plus la teneur en légionelles dans l'eau est importante, plus elle le sera dans l'aérosol.

Il en est de même pour les variables de débit, humidité relative et température de l'air dont la proximité des points souligne une relation positive élevée. Cette observation est corroborée par l'analyse de la matrice de corrélation (Tableau 4.5).

Ainsi, la corrélation positive statistiquement significative à 5% entre les concentrations de légionelles hybridées détectées dans les aérosols de douche et celles détectées dans les eaux chaudes peut être expliquée par le transfert des légionelles s'effectuant de l'eau à l'air.

Enfin, il apparaît également que les variables de débit, volume de la pièce, humidité relative et température de l'air sont corrélées. Quant à la variable volume, elle est corrélée négativement à la température de l'air et à l'humidité : ceci peut être expliqué par des phénomènes de dilution crées par un grand volume de pièce, agissant négativement à la fois sur ces deux variables.

Pour conclure, l'analyse en composante principale a permis de montrer l'existence d'une relation entre les concentrations en légionelles des eaux chaudes et celles des aérosols générés lors de douches, en écartant le rôle que pourraient jouer, dans nos conditions expérimentales, les facteurs environnementaux.

4.2 Relation Explicite entre les Niveaux de Contamination en Legionelles de l'Eau Chaude et de l'Aerosol de Douche

Etant donné que seuls 5 échantillons d'aérosols de douche étaient positifs en *Legionella* cultivables (collectées avec le MAS100®), les analyses suivantes ne prennent en compte que les résultats obtenus avec la technique d'hybridation *in situ*.

Les teneurs en légionelles dans les aérosols de douche ne sont pas corrélées aux facteurs environnementaux ; par contre, elles sont liées aux teneurs de légionelles des eaux chaudes (Tableau 4.6). Plusieurs points clés méritent d'être soulignés à ce propos :

- Lorsque des légionelles ont été détectées dans l'aérosol (28,6%), *Legionella* a toujours été détectée parallèlement dans l'eau. Mais cette relation entre les deux milieux environnementaux (eau et aérosol) reste difficile à définir. Il ne s'agit pas d'une relation linéaire simple (Figure 4.4).
- Lorsque aucune *Legionella* n'a été détectée dans l'eau chaude des douches, aucune *Legionella* n'a été détectée dans leurs aérosols.
- Par contre, pour 52,4% des échantillons, aucune *Legionella* n'a été détectée dans l'aérosol, alors qu'elles l'étaient dans l'eau chaude, et ce pour des concentrations variant de $9{,}0.10^{3}$ à $1{,}6.10^{6}$ *Legionella* hybridées.L^{-1} eau.

Deux hypothèses peuvent être émises : il n'y a pas eu création d'un bioaérosols ; ou plus vraisemblablement, il y a eu création d'aérosol mais il nous a été impossible de détecter des légionelles par hybridation *in situ*, du fait de quantités d'ARNr dans les bactéries insuffisantes pour qu'elles puissent être détectées par FISH, du fait d'un stress lors de l'aérosolisation.

Tableau 4. 6 : Présence combinée de Legionella détectée par l'hybridation in situ dans les eaux chaudes et les aérosols de douche.

Milieu EAU positif[1] (%)	28,6% (47/164)	52,4% (86/164)
Milieu EAU négatif (%)	0% (0/164)	13,4% (22/164)
	Milieu AIR positif[2] (%)	Milieu AIR négatif (%)

[1] $\geq 9.10^3$ *Legionella* hybridées.L^{-1} eau ; [2] $\geq 3.10^2$ *Legionella* hybridées.L^{-1} air.

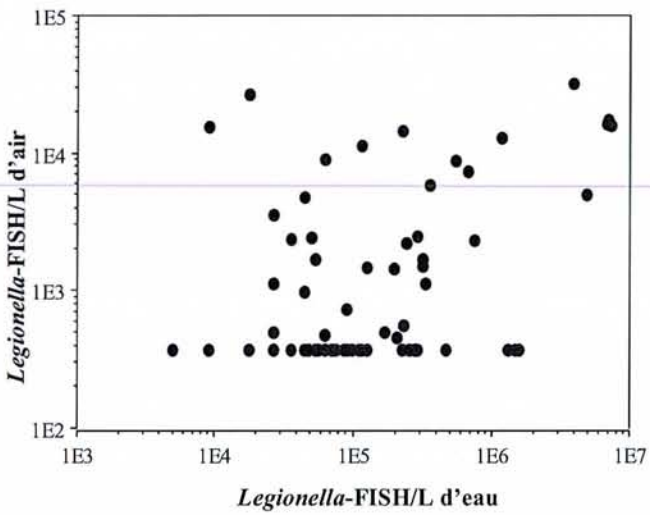


Figure 4. 4 : Concentrations de Legionella détectées par la technique d'hybridation in situ dans les eaux chaudes et les aérosols de douche mesurés au même point de prélèvement (n=164).

Cette relation entre les teneurs de légionelles dans l'eau et dans l'aérosol a été approfondie à l'aide d'un modèle de régression logistique.

Trois classes de concentrations de légionelles dans l'eau chaude ont été établies : absence de légionelles détectables (LD $\leq 9.10^3$ *Legionella*-FISH.L^{-1} eau), > LD à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau et au-delà de 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau.

Ces trois classes de contamination ont été reliées aux teneurs de légionelles détectées dans les aérosols (Tableau 4.7). Quelles que soient les concentrations dans l'aérosol, le risque de détecter des légionelles aérosolisées est croissant avec l'augmentation des concentrations de *Legionella* de l'eau chaude de douche : plus *Legionella* est détectée dans l'eau, plus le risque de détecter *Legionella* dans l'air est grand. Ceci confirme les tendances décrites par l'ACP présentée précédemment.

A concentrations de *Legionella* dans l'eau chaude équivalentes, l'odd ratio décroît lorsque l'on considère des seuils de plus en plus élevés de « positivité » dans l'aérosol (ce qui se traduit par des dilutions de plus en plus importantes du risque) ; mais il croît cependant, pour tous ces seuils, avec des concentrations en légionelles dans l'eau chaude plus importantes.

Tableau 4. 7 : Risque de présence de Legionella détectées par hybridation in situ dans les aérosols de douche, en fonction des concentrations de Legionella hybridées dans l'eau chaude.

	***Legionella*.L^{-1} air ≥ LD[1]**		***Legionella*.L^{-1} air ≥ 10^3**		***Legionella*.L^{-1} air ≥ 10^4**	
***Legionella*-FISH.L^{-1} d'eau**	Odds Ratio	I.C. à 95%	Odds Ratio	I.C. à 95%	Odds Ratio	I.C. à 95%
< LD[2] (n=22)	1,15	1,07-1,35	1,09	1,03-1,24	1,03	1,01-1,14
= LD[2] - <10^5 (n=83)	1,70	1,25-3,51	1,32	1,11-2,11	-	-
≥ 10^5 (n=50)	6,80	2,60-47,08	2,57	1,63-6,25	1,28	1,12-1,77
Test d'homogénéité (χ^2)	$p < 10^{-4}$		$p < 10^{-4}$		p = 0,003	
Test des tendances (χ^2)	$p < 10^{-4}$		$p < 10^{-4}$		p = 0,005	

LD = Limite de Détection ; [1] 3.10^2 *Legionella* hybridées.L^{-1} air ; [2] 9.10^3 *Legionella* hybridées.L^{-1} eau.

5 DISCUSSION

Cette étude nous a permis (i) d'apprécier la faisabilité de mise en oeuvre de différents outils métrologiques nécessaires à la collecte de bioaérosols et de définir une méthodologie de prélèvements d'aérosols afin (ii) d'estimer la présence et la concentration de *Legionella* dans les aérosols générés lors de douche, et cela en utilisant (iii) de manière concomitante deux techniques d'analyse, la culture et l'hybridation *in situ*. Plus d'une centaine de prélèvements ont donc été réalisés aux points de douche de patients résidant dans 34 maisons de retraite de Lorraine, pendant deux ans et demi, de octobre 2003 à novembre 2005.

5.1 BIOCOLLECTEURS ET AEROSOLS DE *LEGIONELLA*

Les résultats présentés dans la première partie de ce chapitre ont permis de montrer que la détection de *Legionella* aéroportée, en chambre d'aérosolisation, était améliorée de 4 à 700 fois avec l'impaction en milieu liquide, par rapport à l'impaction sur milieu solide et à la filtration, respectivement. La technique d'impaction sur filtre n'est pas efficace pour détecter des légionelles présentes dans l'aérosol de douche et l'impaction sur milieu solide sous-estime la détection des légionelles des aérosols. Les mesures réalisées sur site (douche) ont objectivé les résultats de la phase laboratoire, à savoir que seule l'impaction en milieu liquide couplée à une analyse FISH s'est révélée adaptée à la mesure des légionelles aéroportées.

Cette combinaison [impaction liquide-hybridation *in situ*] a permis de détecter des *Legionella* aéroportée pour 28% des échantillons contre seulement 3% avec l'impaction sur milieu solide.

La différence de performance entre les biocollecteurs peut être expliquée par leur efficacité de collecte théorique. En effet, il est admis que tous les microorganismes de taille inférieure au seuil de coupure du biocollecteur sont en théorie "collectables" : l'impaction en milieu liquide est le seul principe de collecte, comparé à l'impaction sur milieu solide et à la filtration, qui a une efficacité théorique de collecte de 100% pour une particule de 1 µm [Jensen *et al.*, 1994].
Mais surtout les trois principes de collecte diffèrent par le milieu de collecte sur lequel les particules aérosolisées s'impactent : gélose, liquide ou filtre. Or, durant la collecte des bioaérosols, le stress du microorganisme est influencé par ce milieu [Stewart *et al.*, 1995 ; Buttner *et al.*, 1991 ; Marthi *et al.*, 1990]. Pour le liquide de collecte, Ishimatsu *et al.* [2001] rapportent qu'avec le milieu BYE le taux de survie de *Legionella* aéroportée est meilleur comparé au tampon salin Page. Stewart *et al.* [1995] prouvent que les dommages subis par les bactéries durant l'impaction sur milieu solide empêche leur cultivabilité. En ce qui concerne la filtration, Li et Lin [1999] ont montré que la survie de *E. coli* dans un aérosol était plus faible qu'avec l'impaction en milieu liquide, en émettant l'hypothèse à nouveau formulé par Durand *et al.* [2002], que le temps d'échantillonnage provoque une forte dessiccation de la bactérie et agit comme un stress, ce qui peut expliquer leur capacité différente à récupérer des microorganismes de l'air viables. Le stress de la dessiccation est d'ailleurs connu pour agir sur la survie bactérienne pendant l'aérosolisation influençant par conséquent la collecte du bioaérosol [Predicala *et al.*, 2002 ; Bollin *et al.*, 1985]. De plus, d'autres travaux ont déjà montré que les supports de collecte secs empêchaient la croissance des microorganismes [Heldal *et al.*, 1996 ; Blomquist *et al.*, 1984].

5.2 Quantification de *Legionella* dans les Aerosols Amelioree par la Methode FISH

Les études portant sur la détection de *Legionella* aérosolisées sont anciennes, restent encore peu nombreuses à l'heure actuelle et utilisent essentiellement la méthode d'analyse par culture. Au cours de nos prélèvements de bioaérosols générés par des eaux chaudes lors de douche, des *Legionella* cultivables ont été détectées seulement à partir de prélèvements par impaction sur milieu solide et ce pour seulement 3% des échantillons. Ce faible taux de recouvrement de *Legionella*, avec ce principe de collecte d'air, est en accord avec la littérature [Bollin *et al.*, 1985].

La méthodologie couplant l'impaction en milieu liquide avec une détection des microorganismes par culture, est décrite notamment par Breiman [Breiman *et al.*, 1990b] et Ishimatsu [Ishimatsu *et al.*, 2001] comme une combinaison efficace pour détecter les microorganismes de l'air par rapport au principe d'impaction sur milieu solide.

Nos essais en chambre d'aérosolisation présentés en première partie de chapitre sont aussi là pour en attester. Il faut cependant souligner que nos essais de terrain n'ont pas permis de détecter des légionelles aéroportées au niveau des douches avec cette association de méthodologies. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer nos résultats environnementaux :

(i) dans l'aérosol des douches, les bactéries aéroportées ne sont pas dans des conditions physiologiques optimales au contraire de celles prélevées en chambre d'aérosolisation, qui étaient des souches pures de *Legionella* cultivées en bouillon nutritif, donc *a priori* « bien portantes » et aérosolisées à partir de suspensions denses;

(ii) le volume échantillonné lors de nos essais en douches était de 195 litres d'air, bien inférieur aux volumes échantillonnés par les impingers de Breiman [Breiman *et al.*, 1990b] et Ishimatsu [Ishimatsu *et al.*, 2001] qui variaient de 240 à 600 litres d'air.

Cependant, il est difficile de s'assurer de la seule pertinence de la méthode culturale pour estimer les concentrations en légionelles dans l'eau. Si cultivabilité (formation d'une colonie sur milieu gélosé) et viabilité (aptitude à se multiplier dans des conditions favorables) sont devenues des synonymes généralement admis dans la littérature, la réciproque est fausse : la non cultivabilité ne reflète pas une non-viabilité des bactéries. Par conséquent, par analogie à la détection de *Legionella* des milieux hydriques, il est admis que la culture sous-estime la population bactérienne réelle dans les matrices environnementales, y compris dans l'air [Griffiths *et al.*, 1996 ; Heidelberg *et al.*, 1997].

En effet, au sein d'une population bactérienne, se trouvent en proportions variables des bactéries cultivables et des bactéries mortes et, entre ces deux extrêmes physiologiques, des bactéries plus ou moins actives, des bactéries dormantes, blessées ou stressées. Les microorganismes ne sont pas toujours cultivables mais peuvent pourtant être viables (aptes à se multiplier) ou métaboliquement actifs, ce qui a introduit les concepts de bactéries «viables non cultivables» (VNC) ou «actives non cultivables» (ANC) pour décrire ces bactéries intactes et actives [Joux et Lebaron, 2000 ; Kell *et al.*, 1998 ; Steinert *et al.*, 1997]. Plusieurs auteurs dont Hussong *et al.* [1987], ont en effet rapporté la détection de légionelles dans l'eau par immunofluorescence alors qu'elles étaient incapables de croître sur milieu gélosé. Nyström [2001] a également rapporté l'incapacité de détecter des légionelles par culture dans des échantillons d'eau mais il a confirmé la présence de légionelles viables après inoculation à des cobayes.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour détecter ces bactéries *in situ* sans l'intermédiaire de la culture, en usant de nouvelles technologies comme la PCR [Joly *et al.*, 2006 ; Wellinghausen *et al.*, 2001 ; Palmer *et al.*, 1993]. Mais cette technique, même si elle permet de détecter des *Legionella* quand la culture ne le permet pas [Pascual *et al.*, 2001], reste purement qualitative et, en l'état actuel des techniques, ne fournit aucune donnée quant à la concentration de *Legionella* dans l'air, puisque le

résultat est exprimé sous la forme d'unités génome, ce qui rend difficile les interprétations, notamment par rapport aux réglementations en vigueur basées sur la culture [Joly *et al.*, 2006].

L'hybridation *in situ* a aussi été proposée par différents auteurs [Manz *et al.*, 1995 ; Joux et Lebaron, 2000] pour estimer une activité physiologique de la cellule. L'hybridation *in situ* cible spécifiquement les ARNr 16S [Williams *et al.*, 1998] et détecte la quasi intégralité des isolats y compris ceux internalisés par les cellules hôtes [Grimm *et al.*, 1998].
Plusieurs études [McKillip *et al.*, 1998 ; Poulsen *et al.*, 1993 ; DeLong *et al.*, 1989] montrent que l'hybridation *in situ* est un outil intéressant pour fournir des renseignements sur les populations bactériennes des milieux environnementaux et sur l'activité physiologique de leurs bactéries : par augmentation des signaux de fluorescence lorsque les bactéries sont en croissance/actives ou par diminution de ces signaux lorsque les bactéries sont stressées. Seuls Lange *et al.* [1997] ont appliqué cette méthodologie à de grand groupe de populations bactériennes d'aérosols générés en laboratoire.
Et, face à la problématique de la cultivabilité des bactéries, cette technique est de plus en plus utilisée notamment dans l'environnement pour détecter spécifiquement certains germes d'intérêt. Son utilisation pour la détection des légionelles des aérosols lors de nos expérimentations, a permis de détecter et de quantifier *Legionella* pour 29% des échantillons contre au mieux 3% avec la culture. Cette technique d'analyse vient d'être utilisée récemment avec succès afin de détecter *Legionella* dans des aérosols générés au niveau de tours aéroréfrigérantes [Mathieu *et al.*, 2006].

5.3 Relation entre Teneurs en *Legionella* de l'Eau Chaude et de l'Aerosol de Douche

En complément des observations des niveaux de concentrations en *Legionella* aéroportée aux points de douche, il semblait intéressant d'expliquer leur présence à partir des données de contamination hydrique et de l'environnement ambiant. L'objectif était de tenter de relier les éléments physiques de l'ambiance de prélèvement ainsi que les teneurs de *Legionella* dans l'eau chaude à la présence de *Legionella* dans l'aérosol généré lors des douches.

Concernant les conditions environnementales lors des prélèvements d'aérosols de douche, nous avons relevé l'humidité relative, connue pour influer sur la survie de ce germe dans l'air [Dennis et Lee, 1988 ; Hambleton *et al.*, 1983], la température de l'air, le débit d'écoulement de l'eau ainsi que le volume de l'espace douche.
Aucune influence de ces facteurs environnementaux sur le transfert de *Legionella* dans l'air n'a pu être établie.

En effet, aucune relation statistique significative entre leurs valeurs et la contamination en *Legionella* aéroportée n'existe, que ce soit en analyse en composante principale, ou en régression logistique (données non présentées ici). Dans nos conditions d'expérience, ces facteurs physiques n'influent donc pas significativement sur la présence de *Legionella* dans l'air.

La deuxième et principale observation a été de constater que pour tous les prélèvements d'aérosols positifs en *Legionella*, cette bactérie a été aussi détectée dans les eaux chaudes pour le même point de douche. Il n'existe *a priori* pas d'autre source d'aérosolisation connue, à part l'eau chaude provenant du pommeau de douche et dirigé contre le mannequin « brise-jet », au sein des espaces douches où ont eu lieu les prélèvements environnementaux. Par conséquent, ces résultats attestent de la probable source de *Legionella* détectées dans les aérosols, i.e. l'eau chaude contaminée lors de la douche.

Nous avons de même constaté que moins d'un tiers des prélèvements présentait à la fois des *Legionella* dans l'eau chaude et dans l'aérosol et ce avec la combinaison méthodologique optimale [impaction en milieu liquide-hybridation *in situ*].
Les analyses statistiques, entreprises sur plus d'une centaine de prélèvements, ont permis de mettre en évidence la relation entre les teneurs de *Legionella* de l'eau et de l'aérosol. Cette relation n'est pas linéaire mais le risque de présence de *Legionella* dans l'aérosol de douche est d'autant plus important que la concentration de *Legionella* retrouvée dans l'eau chaude au même point d'usage est grande. En effet, il y a un risque 6,8 fois plus élevé (I.C. 95% = 2,6 - 47,1) de détecter *Legionella* dans l'aérosol quand la concentration dans l'eau chaude est supérieure à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1}. Ces résultats sont confortés par d'autres études quant à la non linéarité de la relation [Ishimatsu *et al.*, 2001 ; Breiman *et al.*, 1990b , Bollin *et al.*, 1985 ; Dennis *et al.*, 1984]. Mais leurs essais n'étaient pas assez nombreux pour tenter une relation statistique comme celle que nous avons entreprise.

Ce résultat est très prometteur pour une application à l'évaluation du risque *Legionella* et à l'évaluation de l'exposition de personnes sensibles à ce germe pathogène. Mais retenons que l'analyse de l'ensemble de nos données permet d'expliquer au mieux que 42% de la variance totale des résultats. Différentes pistes d'études futures pourraient être envisagées afin mieux prédire cette contamination de l'aérosol et d'appréhender cette notion de transfert :
(i) l'analyse du générateur d'aérosols, le pommeau de douche, dont aucune donnée, mis à part le débit d'écoulement d'eau, n'a été prise en compte ;
(ii) l'analyse physico-chimique de l'eau et son influence sur la survie bactérienne et sur l'état de la bactérie au moment de l'aérosolisation ;
(iii) la bactérie dans l'eau, enkystée ou non dans les amibes, lui fournissant une protection quant aux stress subis pendant l'aérosolisation et peut être au moment de la collecte.

5

ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DU RISQUE LIE À *LEGIONELLA*

Sommaire

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 166
2 SITES D'ETUDE ET REPARTITION DES VOLONTAIRES 167
2.1 ETABLISSEMENTS RECRUTES 167
2.2 REPARTITION DES VOLONTAIRES AU SEIN DES STRUCTURES ETUDIEES 168
3 CARACTERISATION DE LA POPULATION ETUDIEE 169
3.1 CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA POPULATION D'ETUDE 169
3.1.1 Présentation générale 169
3.1.2 Antécédents immunitaires et respiratoires 170
3.2 ETAT IMMUNITAIRE 171
3.3 MANIFESTATIONS CLINIQUES 174
4 RISQUE LIE A L'EXPOSITION A *LEGIONELLA* : FIEVRE DE PONTIAC 175
4.1 DEFINITION OPERATIONNELLE DE LA FIEVRE DE PONTIAC 175
4.2 INCIDENCE DE LA FIEVRE DE PONTIAC 186
4.2.1 Présentation des cas de fièvre de Pontiac 186
4.2.2 Caractéristiques cliniques des cas de fièvre de Pontiac 186
4.2.3 Epidémiologie de la fièvre de Pontiac 188
5 DISCUSSION 189
5.1 SINGULARITES DE LA RECHERCHE ET DE LA POPULATION ETUDIEE 189
5.2 DEFINITION D'UN CAS DE FIEVRE DE PONTIAC 190
5.3 INCIDENCE DE LA FIEVRE DE PONTIAC CHEZ LES PERSONNES AGEES 191

L'objectif de ce chapitre est de présenter l'étude épidémiologique, portant sur les infections à *Legionella* lors d'une exposition à des aérosols d'eaux chaudes générés lors de douche, qui a été réalisée dans une trentaine de maisons de retraite de Lorraine.
Cette étude épidémiologique a permis de mesurer l'incidence de la fièvre de Pontiac au sein de personnes âgées, dans un contexte non épidémique. La finalité de ce chapitre est à la fois la définition, l'identification et la présentation des cas de fièvre de Pontiac.

1 CONTEXTE DE L'ETUDE

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié les teneurs en *Legionella* des eaux chaudes sanitaires et des aérosols générés par les douches. L'observation des teneurs parfois élevées en *Legionella* dans les réseaux d'eaux chaudes sanitaires pose la question du risque résultant de l'exposition des populations. En effet, ces recherches ont eu lieu dans des établissements collectifs accueillant un public sensible, des personnes âgées et donc plus fragiles que la population générale.

Legionella est capable de provoquer plusieurs formes cliniques de maladies qui se distinguent par des atteintes respiratoires graves (la maladie du Légionnaire) et des formes bénignes d'un état pseudo-grippal (la fièvre de Pontiac) [Jarraud *et al.*, 2000]. Quelle que soit la forme clinique associée, la voie de transmission est l'inhalation d'aérosols issus d'eau contaminée par *Legionella* [Fields *et al.*, 2001].

La maladie du Légionnaire, dont les épidémies depuis 30 ans, sont en évolution croissante [Joseph, 2004] fait l'objet de nombreux travaux de recherche et est maintenant bien connue par le milieu médical. Toutefois, la forme bénigne de légionellose, la fièvre de Pontiac dont l'occurrence est rare n'est pas encore bien caractérisée ni même définie de manière consensuelle.
Cliniquement, les symptômes de la fièvre de Pontiac sont semblables à une grippe : fièvre, asthénie, myalgies, arthralgies, céphalées, toux, nausées et gorge endolorie [Castor *et al.*, 2005]. Des études rapportent d'autres signes cliniques tels que : dyspnée, douleurs thoraciques [Castor *et al.*, 2005 ; Fields *et al.*, 2001], vomissements et diarrhées [Castor *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003 ; Benin *et al.*, 2002].

Les patients guérissent spontanément en deux à cinq jours, généralement sans traitement [Bornstein et Fleurette, 1992 ; Fraser *et al.*, 1979]. Mais le diagnostic clinique varie d'une étude à l'autre et aucune ne propose de définition clinique unique.

Dans notre étude, le préambule indispensable était donc de donner une définition opérationnelle d'un cas de fièvre de Pontiac, suite à une exposition à *Legionella* via les aérosols de douche, et d'en évaluer son incidence au sein d'une population de personnes âgées résidant dans une trentaine de maisons de retraite de la région Lorraine. L'étude épidémiologique a été réalisée de Juin 2003 à Novembre 2005 ; la durée de suivi au sein de chacune des structures de santé était de quatre mois.

Ce chapitre s'organise en quatre parties : d'une part, le contexte de l'étude épidémiologique menée dans les maisons de retraite de Lorraine ainsi que la population âgée volontaire sont présentées. Dans un deuxième temps, est proposée une définition opérationnelle de la fièvre de Pontiac. Elle permet, dans un troisième temps, d'évaluer l'incidence de la fièvre de Pontiac, au sein de cette population fragile. Enfin, une discussion générale des résultats est présentée.

2 SITES D'ETUDE ET REPARTITION DES VOLONTAIRES

2.1 ETABLISSEMENTS RECRUTES

Les démarches entreprises afin de faire adhérer les établissements de santé et leurs résidents à l'étude épidémiologique ont été définies dans le chapitre 2. La phase de recrutement a débuté en Janvier 2003 pour se clôturer en Juin 2005. Elle a permis l'engagement volontaire, dans l'ensemble de la région Lorraine, de 34 maisons de retraite avec 828 de leurs résidents. Chacun d'entre eux a fait l'objet d'un suivi clinique quotidien sur 4 mois, à la fin desquels les prélèvements biologiques et environnementaux ont été effectués.

La répartition de l'ensemble des sites concernés par l'étude a été présentée dans le chapitre 3 (Figure 3.1) et nous présentons ci-dessous, la répartition globale des volontaires et des sites en fonction des quatre départements géographiques (Figure 5.1).

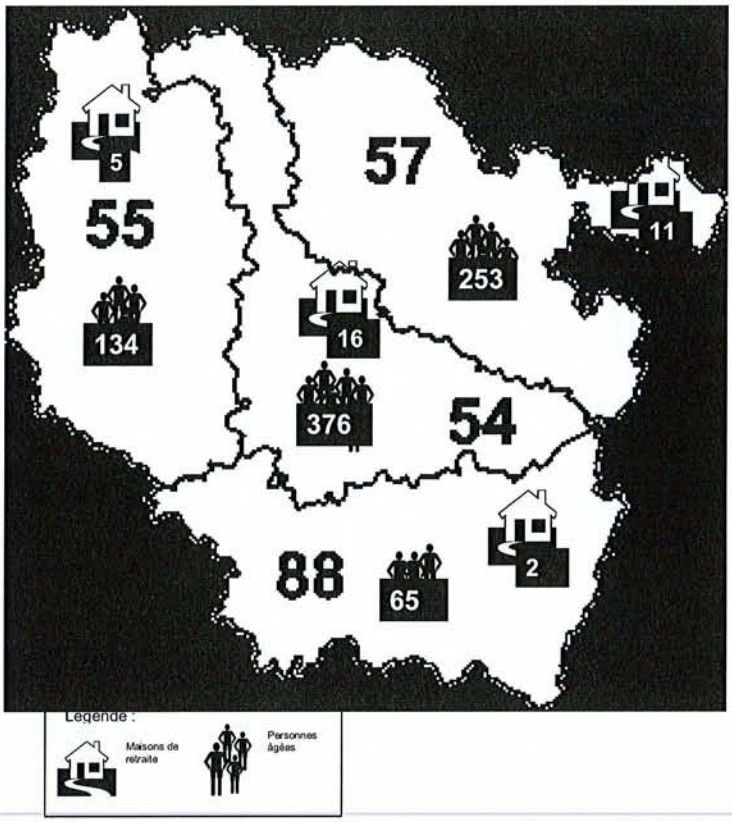


Figure 5. 1 : Répartition départementale des établissements de santé et des effectifs des volontaires.

2.2 Repartition des Volontaires au sein des Structures Etudiees

L'effectif de recrutement au sein des structures de santé est dépendant, d'une part de la capacité totale en lits des établissements mais surtout de la motivation des équipes soignantes pour participer et faire adhérer les résidents à l'étude épidémiologique selon les critères d'inclusion. Le principal obstacle à l'inclusion était la prise de douche hebdomadaire des personnes âgées, beaucoup se douchant moins souvent.

De ce fait, les 828 personnes âgées recrutées ne sont pas réparties de façon homogène ni au sein des départements, ni au sein des structures de santé.
Ainsi, l'effectif de recrutement varie de 10 à 50 personnes âgées, suivant les structures. La moyenne des recrutements des résidents par établissement varie de 23 à 32 personnes âgées selon les départements (Figures 5.2). La médiane de l'effectif de recrutement par structure de santé est de 24 personnes âgées.

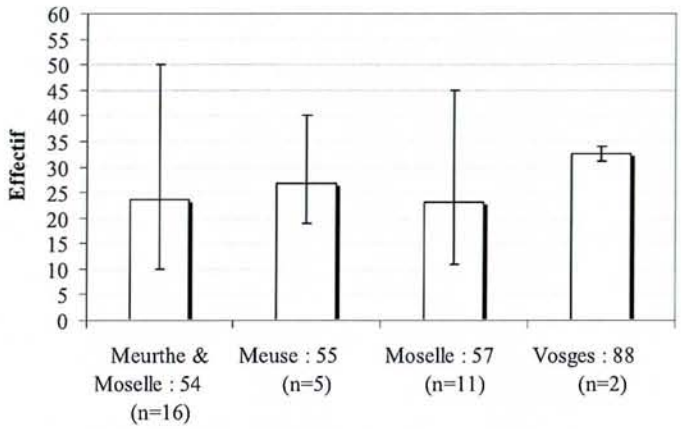


Figure 5. 2 : Répartition des effectifs moyens des volontaires au sein des maisons de retraite selon les départements lorrains (n=34). Les barres d'erreur correspondent au minimum et au maximum de l'ensemble des données obtenues.

3 CARACTERISATION DE LA POPULATION ETUDIEE

3.1 CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA POPULATION D'ETUDE

3.1.1 Présentation générale

Les 828 personnes âgées, résidents volontaires de maisons de retraite ont une moyenne d'âge élevée (81,6 $\pm$ 10 ans) (Tableau 5.1) et sont constitués de 2/3 de femmes : les femmes sont d'ailleurs plus âgées que les hommes avec une moyenne d'âge de 83 ans ($\pm$9) contre 78 ($\pm$10) ans. L'âge minimum des sujets est de 46 ans, le maximum de 102 ans ; la médiane d'âge pour l'ensemble des sujets est de 82 ans.

Au niveau tabagique, seulement 6,2% des personnes âgées sont des fumeurs actifs contre 80,9% constitués de non-fumeurs. Les pratiques tabagiques des hommes sont d'ailleurs significativement supérieures à celles des femmes : le sexe ratio (homme/femme) est de 2,5 à la fois pour le tabagisme passé ($p<10^{-4}$) et pour le tabagisme actuel ($p<10^{-3}$).

Tableau 5. 1 : Description de la population de personnes âgées volontaires (n=828).

Caractéristiques	Catégorie	Effectif - % (n)
Age[1]	< 50 ans	0,4 (3)
	50 – 69 ans	11,4 (88)
	70 – 89 ans	**63,8** (494)
	≥ 90 ans	24,4 (189)
Genre	Masculin	29,8 (247)
	Féminin	**70,2** (581)
Tabagisme	Fumeur	6,2 (51)
	Non-fumeur	**80,9** (670)
	Ancien fumeur	12,9 (107)

[1] calculs réalisés sur un effectif de 774 personnes car 54 données d'âge manquantes.

Un des critères d'inclusion (chapitre 2) et d'exposition des personnes âgées à *Legionella* est la prise de douche au minimum hebdomadaire. Nous avons donc évalué l'exposition des personnes âgées aux aérosols générés lors de douche, en recensant l'ensemble des prises de douche des volontaires. Il s'est avéré que la moyenne de prise de douche hebdomadaire est de 1,1 douches ($\pm$0,7) : ce critère d'inclusion est donc bien respecté.

3.1.2 Antécédents immunitaires et respiratoires

L'état de santé, et donc la susceptibilité, des personnes âgées est évalué par le recensement de leurs antécédents respiratoires et immunitaires. Ces données ont été renseignées par le médecin coordinateur de chaque maison de retraite lors de l'inclusion des volontaires.

Comme attendu dans le cas d'une étude épidémiologique incluant des personnes âgées, le Tableau 5.2 renseigne que les 2/3 des sujets présentent au moins un antécédent (soit respiratoire soit immunitaire). Par ailleurs, environ le quart des sujets (26,4%) présente des antécédents dits cognitifs regroupant les pathologies de type démence, débilité, syndrome de Parkinson, … . Il est à noter que la distribution des antécédents de santé de la population masculine ne diffère pas de ceux de la population féminine.

Tableau 5. 2 : Fréquence des antécédents relevés chez les personnes âgées (n=828).

Antécédent pathologique	Effectif - % (n)
Respiratoire	14,8 (123)
Immunitaire	72,2 (598)
Cognitif	26,4 (219)

Les antécédents respiratoires concernent 15% de la population d'étude. Ils peuvent être de plusieurs types dont les principaux sont illustrés par la figure 5.3. Il s'agit, dans un ordre décroissant de fréquence, de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (53,0%), pneumopathie ou tuberculose pulmonaire (13,3%), d'asthme (10,8%) ou d'insuffisance respiratoire (9,6%).

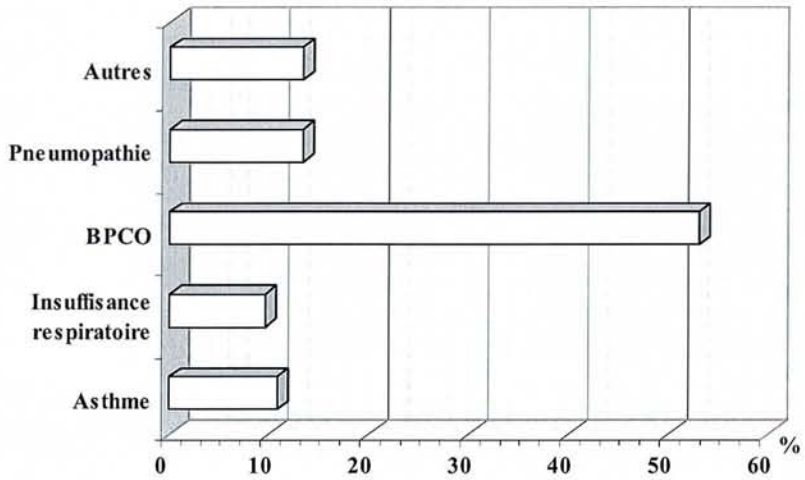


Figure 5. 3 : Fréquence des principaux antécédents respiratoires chez les personnes âgées des 34 maisons de retraite (n=123).

Deux tiers des personnes âgées présentent des antécédents immunitaires. Les principales pathologies immunitaires enregistrées sont des comorbidités (35%) regroupant les pathologies rénales, hépatiques, neurologiques (non cognitives), psychiatriques, … (Figure 5.4). Par ailleurs, 16% des personnes âgées sont diabétiques. Enfin, moins de 10% ont présenté/présentent soit un cancer, soit une pathologie hématologique ou cardiovasculaire, soit ont consommé/consomment de l'alcool.

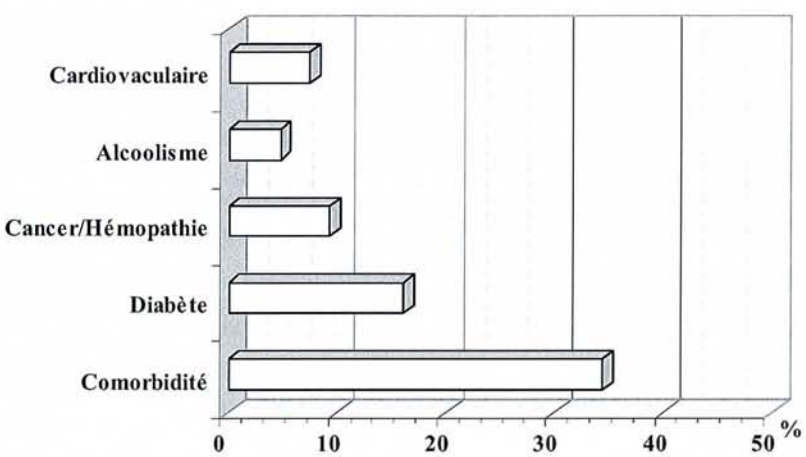


Figure 5. 4 : Fréquence des principaux antécédents immunitaires chez les personnes âgées (n=828).

3.2 ETAT IMMUNITAIRE

La caractérisation de l'état immunitaire des personnes âgées de l'étude vis-à-vis de *Legionella* est réalisée au travers de prélèvements biologiques (sang et urine) au terme des 4 mois d'enregistrement épidémiologique. Les échantillons ont été prélevés par des infirmières de recherche clinique, en collaboration sur ce projet et analysés par le Centre National de Références des légionelles (CNR) de Lyon (chapitre 2, § 1.4).

Pour la totalité des urines collectées, la recherche de l'antigène urinaire de *L. pneumophila* SG.1 s'est révélée négative. L'état immunitaire des personnes âgées n'a donc été évalué qu'au travers des dosages des titres des différents anticorps anti-*Legionella* dirigés contre 10 espèces de *L. pneumophila* et 8 espèces de *Legionella* autres que *L. pneumophila* (chapitre 2, § 7.2).

L'étude épidémiologique porte plus particulièrement sur les signes évocateurs de la fièvre de Pontiac, c'est pourquoi, aussi bien les titres faibles (<1/16 à 1/64) qu'élevés (≥1/128) en anticorps anti-*Legionella* ont été pris en compte. Rappelons ici que les anticorps anti-*Legionella* sont considérés dans l'étude comme des marqueurs biologiques d'exposition.

La figure 5.5 illustre les prévalences des 18 anticorps anti-*Legionella* à différents titres pour 671 personnes âgées sur les 828 volontaires inclus : la déficience et le mauvais état du capital veineux des personnes âgées n'ont pas permis la réalisation de tous les prélèvements sanguins. Selon les espèces recherchées, de 89% à 99% des dosages d'anticorps anti-*Legionella* sont négatifs (< 1/16 ou <1/64). Les titres positifs au 1/16ème sont les plus fréquemment retrouvés avec une fréquence de 5,1% suivis des titres au 1/64ème avec une fréquence de 2,1%. Tous titres et toutes espèces confondues, le titre d'anticorps anti-*L. pneumophila* SG.6 positif au 1/16ème est le plus retrouvé (7,9%) dans notre population d'étude. Les anticorps des titres de sérum élevés ≥1/128ème sont dirigés contre les espèces non *L. pneumophila* plutôt que contre les espèces de *L. pneumophila* : au titre 1/128, 64% des sérums positifs sont dirigés contre les espèces non *L. pneumophila*, 71,4% au titre 1/256 et 88,9% au titre 1/512.

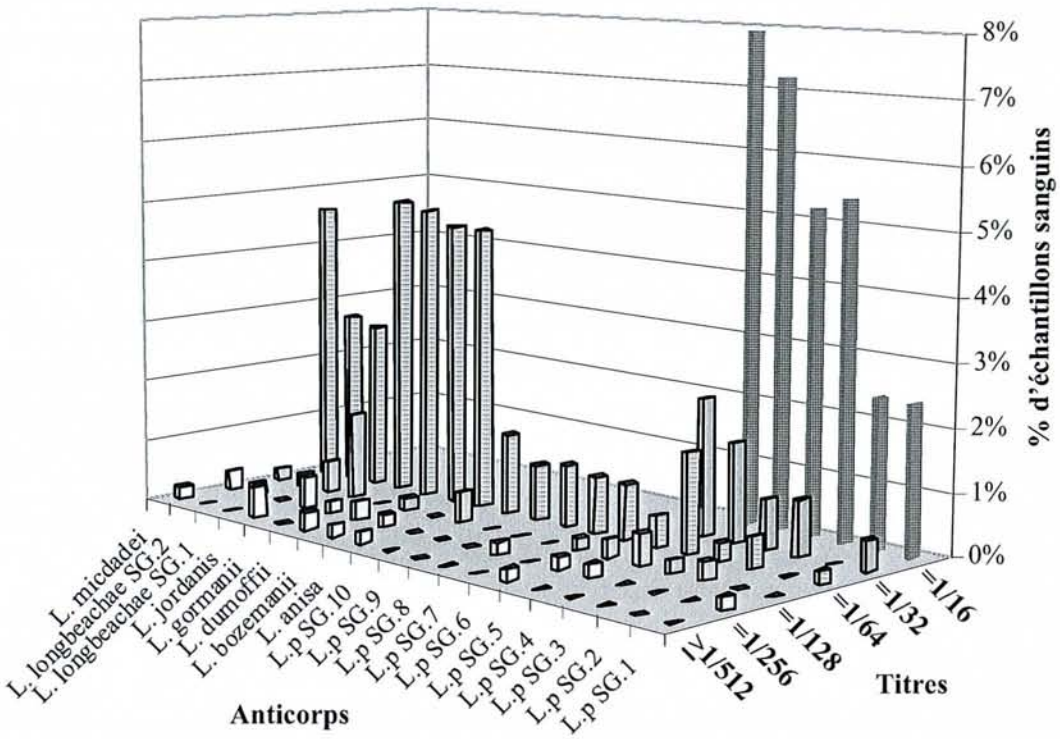


Figure 5. 5 : Prévalence des anticorps anti-Legionella en fonction des titres des sérums (n=671).

Afin d'estimer plus précisément la prévalence des différents titres d'anticorps, seul le titre du sérum le plus élevé, toutes espèces de légionelles confondues, de chaque individu est pris en compte : ainsi, une personne ne peut être comptabilisée qu'une fois (Tableau 5.3). La détectabilité d'anticorps anti-*Legionella* parmi la population d'étude obtenue en tenant compte des titres faibles est d'environ 30% pour les titres de sérum positifs au 1/16ème, de 20% à la fois pour les titres positifs au 1/32ème et au 1/64ème.

Tableau 5. 3 : Prévalence des titres maximum[1] d'anticorps anti-Legionella chez les personnes âgées (n=671).

Types d'anticorps	**Tous les anticorps**	**anti-*L. pneumophila***	**anti-*Legionella, autre que L. pneumophila***
Titres des sérums	**% (n)**	**% (n)**	**% (n)**
Inférieur à la LD[2]	71,0 % (477)	81,1 % (544)	82,8 % (556)
Positif au 1/16	28,9 % (194)	17,7 % (119)	17,1 % (115)[3]
Positif au 1/32	20,3 % (136)	7,6 % (51)	17,1 % (115)[3]
Positif au 1/64	17,1 % (115)	4,7 % (32)	17,1 % (115)
Positif au 1/128	5,5 % (37)	1,8 % (12)	5,5 % (37)
Positif au 1/256	3,1 % (21)	0,7 % (5)	3,1 % (21)
Positif au 1/512	1,2 % (8)	0,1 % (1)	1,2 % (8)

[1]Pour chaque patient, seul le titre en anticorps le plus élevé est considéré parmi les 18 dosages; LD : Limite de Détection ; [2]LD=1/16 pour *L. pneumophila* SGs 1-6 et 1/64 pour les autres ; [3]Titre de sérum analysé à partir de 1/64.

La prévalence du titre de sérum positif au 1/64ème au sein de la population de personnes âgées est plus haute pour *Legionella* non *pneumophila* (17,1%) que pour *L. pneumophila* (4,7%) (Tableau 5.3).

Parmi les anticorps dirigés contre les espèces autres que *L. pneumophila*, les principaux titres d'anticorps identifiés sont les anticorps anti-*L. jordanis* (7,3%), suivis par les anticorps anti-*L. dumoffii* (5,4%) et les anticorps anti-*L. micdadei* (5,3%). Pour les anticorps anti-*L. pneumophila*, principalement les sérogroupes 6 (11,3%), suivis par les sérogroupes 5 (11,1%) et les sérogroupes 3 (7,1%) ont été identifiés.

Il est à noter que 5,5% des sujets ont un titre d'anticorps positif au 1/128 mais qu'aucun cas de légionellose ni de signe clinique pouvant y être associé n'a été détecté durant le suivi épidémiologique de 4 mois.

3.3 Manifestations Cliniques

Pendant les 4 mois de suivi épidémiologique (chapitre 2, § 2.2), l'ensemble des signes cliniques, potentiellement évocateurs de fièvre de Pontiac présentés par les personnes âgées ont été répertoriés.

Les personnes âgées qui, au cours des 4 mois, ont présenté au moins un signe clinique, parmi ceux du Tableau 5.4, sont au nombre de 323, soit 39,0% de la population totale d'étude. Dans un ordre de fréquence décroissant, les signes les plus fréquemment rencontrés, au moins une fois par personne, sont des symptômes d'ordre général (41,9%) répertoriant à la fois les troubles neurologiques (confusion, difficultés de mémorisation et de concentration), les nausées, angines, … .

Les symptômes pouvant être évocateurs de fièvre de Pontiac, au sens de la littérature, ont été peu fréquemment présents chez les personnes âgées : de 2,8% (myalgie) à 27,7% (diarrhée). Une fièvre a été recensée chez 11,8% des personnes âgées.

Tableau 5. 4 : Signes cliniques évocateurs de fièvre de Pontiac présentés par les personnes âgées au cours de l'étude (n=828).

Signe clinique	Effectif ; % (n)
Fièvre*	11,8% (98)
Toux	21,3% (176)
Diarrhée	27,7% (229)
Céphalées*	5,6% (46)
Asthénie	10,1% (84)
Myalgies*	2,8% (23)
Vomissements	15,0% (124)
Frissons*	3,7% (31)
Vertiges	5,7% (47)
Autres	41,9% (347)

4 RISQUE LIE A L'EXPOSITION A *LEGIONELLA* : FIEVRE DE PONTIAC

4.1 DEFINITION OPERATIONNELLE DE LA FIEVRE DE PONTIAC

La fièvre de Pontiac est une manifestation d'une infection par les bactéries du genre *Legionella*. Du fait de la symptomatologie bénigne et non spécifique, la fièvre de Pontiac passe souvent inaperçue et par conséquent, les renseignements concernant son occurrence sont rares. De ce fait, la pathogenèse de la fièvre de Pontiac est mal connue et il n'existe pas à l'heure actuelle de données fixes sur la durée d'incubation, les signes cliniques ainsi que les espèces de *Legionella* mises en cause. Il n'existe donc pas, à ce jour, de définition clinique unique d'un cas de fièvre de Pontiac.

Nous avons donc proposé une définition clinique de la fièvre de Pontiac à partir des données recueillies au sein de la population de personnes âgées des maisons de retraite de Lorraine. Cette définition est présentée sous la forme d'une publication parue dans la revue *BMC Public Health* (Vol. **6**, n° 112) sous le titre « Pontic Fever : an operational definition for epidemiological studies ».

BMC Public Health

BioMed Central

Research article

Open Access

Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies

Paul Tossa[1], Magali Deloge-Abarkan[1], Denis Zmirou-Navier[1], Philippe Hartemann[1] and Laurence Mathieu*[2]

Address: [1]Département Environnement et Santé Publique and INSERM ERI 11, Henri Poincaré University, Nancy, School of Medicine – 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184 – 54 505 Vandoeuvre lès Nancy, France and [2]Laboratoire d'Hydroclimatologie Médicale Santé Environnement, Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE) and INSERM ERI 11, Nancy, School of Medicine – 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184 – 54 505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Email: Paul Tossa - Paul.Tossa@nancy.inserm.fr; Magali Deloge-Abarkan - Magali.deloge@medecine.uhp-nancy.fr; Denis Zmirou-Navier - Denis.Zmirou@nancy.inserm.fr; Philippe Hartemann - philippe.hartemann@medecine.uhp-nancy.fr; Laurence Mathieu* - laurence.mathieu@medecine.uhp-nancy.fr

* Corresponding author

Published: 28 April 2006

BMC Public Health 2006, 6:112 doi:10.1186/1471-2458-6-112

Received: 08 November 2005

Accepted: 28 April 2006

This article is available from: http://www.biomedcentral.com/1471-2458/6/112

© 2006 Tossa et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Pontiac fever is usually described in epidemic settings. Detection of Pontiac fever is a marker of an environmental contamination by *Legionella* and should thereby call for prevention measures in order to prevent outbreak of Legionnaire's disease. The objective of this study is to propose an operational definition of Pontiac fever that is amenable to epidemiological surveillance and investigation in a non epidemic setting.

Methods: A population of 560 elderly subjects residing in 25 nursing homes was followed during 4 months in order to assess the daily incidence of symptoms associated, in the literature, with Pontiac fever. The water and aerosol of one to 8 showers by nursing home were characterized combining conventional bacterial culture of *Legionella* and the Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) technique that used oligonucleotides probes specific for *Legionellaceae*. A definition of Pontiac fever was devised based on clinical symptoms described in epidemic investigations and on their timing after the exposure event. The association between incidence of Pontiac fever and shower contamination levels was evaluated to test the relevance of this definition.

Results: The proposed definition of Pontiac fever associated the following criteria: occurrence of at least one symptom among headache, myalgia, fever and shivers, possibly associated with other 'minor' symptoms, within three days after a shower contaminated by *Legionella*, during a maximum of 8 days (minimum 2 days). 23 such cases occurred during the study (incidence rate: 0.125 cases per person-year [95% CI: 0.122–0.127]). A concentration of *Legionella* in water equal to or greater than $10^4.L^{-1}$ (FISH method) was associated with a significant increase of incidence of Pontiac fever ($p = 0.04$).

Conclusion: Once validated in other settings, the proposed definition of Pontiac fever might be used to develop epidemiological surveillance and help draw attention on sources of *Legionella*.

BMC Public Health 2006, 6:112 http://www.biomedcentral.com/1471-2458/6/112

Background

Pontiac fever (PF) is the mild form that takes infection by *Legionella*. It usually appears on an epidemic mode and is not associated with pneumonia [1]. Like for Legionaires' disease, infection stems from inhalation of an aerosol contaminated by *Legionella* [2]. Clinically, Pontiac fever's symptoms mimic influenza, with fever, asthenia, myalgia, arthralgia, headache, cough, nausea and sore throat [1,3]; other symptoms such as dyspnea, thoracic pains [2-4] vomiting and diarrhoea [3,5,6] have also been described. Patients recover in two to five days, without treatment [7-9].

Because of its benignity and lack of specificity, the occurrence of PF is often undiagnosed and is therefore less reported than Legionnaires' disease. Epidemiologically, PF is characterized by a short incubation period (typically 30 to 90 hours, with an average of 36 h), a high attack rate (70 to 90%) [1], and absence of fatalities or long term complications [2]. Age, gender and smoking do not seem to be risk factors [10,11]. Rather, PF seems to affect preferentially young subjects: the age of cases was 36 to 39 years in the original Pontiac episode [12,13], and age medians during different documented epidemics were 29 [4,10], 30 [3] and 32 years [11]. Pathogenesis of the PF is poorly known. To date, there is no consensus on the duration of the incubation period, on its clinical symptoms, nor on the causal species of *Legionella*.

Different serogroups (SGs) of *Legionella pneumophila* (*Lp*) (1, 6 and 7) [14-16], as well as *L. feeleii* [12,17], *L. micdadei* [2,11,12], *L. anisa* [13] can cause PF. In terms of diagnosis, according to some authors, PF develops the same serological characteristics as Legionnaires'disease [10,18]. Others claim on the contrary that serology during of a PF is inconstantly positive [19]. Presence of urinary antigen is not systematic either, even for epidemics connected to *Lp* SG 1 [10,20].

Detection of PF is a marker of an environmental contamination by *Legionella* and should thereby call for prevention measures. Efforts to standardize the definition of PF may facilitate comparison of risk levels and help draw attention on sources of *Legionella*. In this article, based on data from the Legion'Air project, we propose an operational definition of PF for the purpose of surveillance and epidemiological studies.

Methods

The objectives of the Legion'Air project are: 1) to assess the exposure of elderly people residing in nursing homes to *Legionella* through aerosols generated by hot-water during showers, and 2) to evaluate the risk that is associated with this exposure.

Nursing homes solicited to participate in the Legion'Air project were located in the Lorraine region, north east of France. The selection process was based on the capacity of the nursing homes and on practical considerations (it should be located not too far from the study centre); no consideration was given to prior knowledge of contamination of the hot water system, in order to prevent selection bias.

This epidemiological study is a retrospective follow-up study. A population of 560 elderly volunteers (informed consent was obtained from patients or guardians) have been followed during 4 months. A set of predefined symptoms were registered daily by the auxiliary nursing staff, symptoms that had been previously reported in the literature in case of PF (table 1). Data were collected on demographic characteristics, current and/or past smoking habits, relevant medical history (respiratory and immunity-related conditions, such as diabetes and cancer) and current prescription of immunosuppressive therapy and of antibiotic medicines. A dedicated nurse insured the quality of recordings in the registers by alternating on site visits and telephone calls during the 4 months.

Volunteers included in the study were those who took at least one shower weekly. As shower practice represented the key exposure determinant (none of the participating nursing homes had air conditioning), data about shower habits were also recorded (the day and the room where the shower was taken).

At the end of the 4 months study, blood and urine samples were taken to assay anti *Legionella* antibodies and urine antigens of *Lp* SG 1. The antibodies of interest were anti-*Lp* (SG 1 to 10) and other *Legionella* species (*anti-L.micdadei*, anti-*L.bozemanii*, anti-*L.dumoffii*, anti-*L.gormanii*, anti-*L.jordanis*, anti-*L.longbeachae* SGs 1 and 2, anti-*L.anisa*). All biological analyses were undertaken by the National Reference Center for *Legionella* in Lyon, France. Biological samples were collected and transported to guarantee their stability. The Nancy University Hospital ethics committee approved the study design and the biological sampling procedures.

To characterize exposure, shower water and aerosol of shower have been sampled. Sampling points were chosen in order to be representative of the exposure of the elderly volunteers. All showers could not be sampled, for practical and financial reasons. Thus, a prior evaluation of the hot water system (design, mode of hot-water production, maintenance of point-of-use, water temperature and treatment) was undertaken in each nursing home in order to assess its criticity in terms of *Legionella* risk and to identify the sampling points (showers) that fitted the best with the volunteers' exposure. Accordingly, each nursing home

Table 1: Clinical data during Pontiac fever episodes described in the literature [references]

Reference	Source of exposure	Incubation period (hours)	Episode (duration)	Symptoms	Type and antibody titers	Legionella species
[2]	Spa with jacuzzi/pool	From 9 to 67 (mean = 38)		**Myalgia**[a], **Headache**[b], Asthenia, **Shivers**, **Fever**, Cough, Nausea, Sore throat[c] Dyspnea[c]		*L. micdadei*
[3]	Washing with high pressure water			**Fever**[a], **Shivers**[a], Asthenia[a], Thoracic pain, **Headache**[b], **Myalgia**[b], Nausea, Cough, Dyspnea, Vomiting, Diarrhoea, Abdominal pain, Ocular redness with photophobia Sore throat	1/128 and 1/256	*L. pneumophila* SGs 1, 3, 4 and 6 and *L. londiniensis*
[4]	Cooling towers	36 to 90	2 - 5 days	**Fever**, Lombago, Arthralgia, **Headache**, Dyspnea, Asthenia Sore throat	Anti-Lp SG7 1/16 to 1/256	*L. pneumophila* SG7
[5]	Decorative fountains	49	7 1 hours	**Fever**[a] **Myalgia**[b], **Headache**[b], **Shivers**[b], asthenia, Back pain Nausea, Cough, Vertigo Cramps Diarrhoea[c] Vomiting	Anti-Anisa: 1/128 to 1/512	*L. Anisa*
[6]	Spa with jacuzzi/pool		1 - 5 days	Diarrhoea, Vomiting, **Headache**, Nausea, **Myalgia**, Cough[c]	Anti-Lp SG Titer >1/64	*L. pneumophila* SG6
[10]	Cooling towers			**Myalgia**, **Shivers**, Asthenia, **Fever**, **Head ache**	Urinary Ag	*L. pneumophila* SG1
[26]	Spa			**Fever**, **Shivers**, Thoracic pain, Cough, Nausea	Anti-Lp SG6	*L. pneumophila* SG6

a : symptom met in all subjects ; b : symptoms met the most ; c : symptoms met the least;

was split, if appropriate, in several sectors. Study participants were allocated to each sector according to where they usually took their shower. One to eight showers were sampled by nursing home.

At the end of the follow-up, sampling of each shower point was performed twice, two days apart; only the hot water faucet was opened to its maximum flow. For each run, two water samples, collected in sterile bottles, were systematically taken: one on the first stream (300 mL); the other (1 litre) after 7 minutes of water draining (which is the average duration of a shower [21]).

Airborne and water *Legionella* was quantified by whole cell fluorescent in situ hybridisation (FISH) using a mix of three specific probes validated for *Legionella* [LEG705, LEG226 and LEGPNE1] [22,23]. In parallel with the FISH detection, the culturable fraction of *Legionella* was evaluated with the standard method (AFNOR NF T 90-431) [24]. The theoretical detection limits of the FISH technique in the study conditions are respectively 3.10^2/L of air and 9.10^3/L of water. Its specificity and sensitivity are 72% and 67% [25].

The bioaerosol sampling began only after the faucet of hot water was closed (i.e. after 7 minutes flushing). Two different biosamplers were used: a MAS-100® (impaction on culture medium: GVPC) and an SKC Impinger (impaction on liquid medium: distilled water). *Legionella* count was done by culture using the MAS-100® sampler (two air volumes were collected: 50 L and 500 L), and by culture and the FISH technique using the Impinger (air volume collected: 195 L).

Case definition

Table 1 summarizes descriptive data from the literature on PF. The symptoms are not specific; there is not to date an agreed clinical definition of PF. Symptoms that predominate in the PF studies are headache, myalgia and fever and, to a lesser extent, shivers, a consequence of infection. These 4 symptoms will be qualified as "major symptoms". Similarly, the other symptoms showed in table 1 will be considered as "minor symptoms".

Based on these literature data, we chosen the interval of 24 to 72 hours after shower as the duration of the incubation period. Hereafter will be qualified as "evocative symptoms of a PF" these major symptoms, possibly associated to minor symptoms, insofar as they have occurred 24 to 72 hours subsequently to a shower. The duration of the PF episode reported in the literature varies from 1 to 5 days; we decided to spread this duration until a new exposure event (eg a new shower) without exceeding a maximal duration of 8 days. A case of PF will be then defined if all the following criteria are met: (i) it occurred within the three days after a shower and exhibited at least one of the major symptoms, associated or not with minor symptoms ; (ii) this episode lasted at least two days, not exceeding eight days ;(iii) since antibiotics treatment could mask some PF symptoms, we included in this definition all

BMC Public Health 2006, 6:112 http://www.biomedcentral.com/1471-2458/6/112

Table 2: Description of the population : age, gender, medical history and smoking status

	Sample size	Mean age (standard-error)	Previous pathologies	Previous immunity conditions	Previous respiratory conditions	Current smokers	Past smokers
Male	158 (28.2%)	77 (± 9)	117 (74.0%)	37 (23.4%)	20 (12.6%)	20 (12.7%)	27 (17.1%)
Female	402 (71.9%)	82 (± 9)	290 (72.1%)	94 (24,3%)	54 (13.4%)	22 (5.5%)	41 (10.2%)
Total	560 (100%)	81 (± 9)	407 (72.7%)	131 (23.4%)	74 (13.2%)	42 (7.5%)	68 (12.1%)

symptoms or association of symptoms lasting at least one day among subjects who had taken antibiotics this very day if at least one of these symptoms was a "major" one ; (iv) *Legionella* had to be detected in water and/or aerosol of the index shower that was selected as representing exposure of the case.

We explored two other definitions of a Pontiac episode, in a view to perform a sensitivity analysis. These alternative definitions focus on fever, viewed as the sole major symptom. In the first one, fever could be associated or not with another symptom (among those listed in table 1); in the second, fever was necessarily associated with at least one other symptom. All other criteria (lag after shower, duration of episode and contamination of water and/or of aerosol) were as described above.

Data analysis

Epi info version 3.3 and SAS were used for data management and analysis. All subjects were ascribed to a shower ward; those having used more than one shower in the course of the study were ascribed to the shower the most contaminated. The exposure value that was retained among the 6 samples available [4 water samples (two runs with two samples: first flow and after draining) and 2 aerosols samples (MAS-100 and SKC Impiger)] was the greatest *Legionella* count that was found, respectively by culture and by FISH.

For antibody titers, different "positivity" thresholds were tested. *Legionella* infection were considered as present beyond increasing sera titers, irrespective of the species or *Legionella* serogroups.

The association between the incidence of PF and contamination of showers were tested with chi squares on incidence rates, and the association with the prevalence of antibody titers by means of the regular chi square test. Tests are one sided, and p values are computed after the exact Fisher test.

Results

The study population consists in 560 elderly volunteers from 25 nursing homes of Lorraine. Their age and known risk factors are described in table 2. Women represent more than 2/3 of the study population and are, on average, older than male volunteers ($p < 10^{-4}$). Ages ranged from 46 to 102 years, the median value being 81 years. The population is constituted of 12.1% of ex-smokers and 7.5% of current smokers. Three quarters of subjects had a history of at least one previous medical condition (respiratory disorder, conditions impairing immunity or other), without gender difference.

Incidence of Pontiac fever

Among the 560 volunteers, 23 subjects had the clinical events corresponding to our definition of PF during the 4 months of follow-up; one subject had twice the clinical event, yielding 24 infectious episodes of PF. The global incidence rate was 0.125 cases per person-year [95% confidence interval: 0.122–0.127]. These cases reside in 13 of the 25 nursing homes. For 10 homes, only one case was reported; two cases occurred in the same nursing home, 4 and 7 cases respectively in two other institutions. In addition to this space clustering, these cases exhibited a time aggregation: less than 10 days separated, respectively, the 2 and the 4 cases that occurred in the same nursing homes. The same held true for 5 out of the 7 cases that occurred in the same nursing home. Figure 1 displays the epidemic curves for these three nursing homes.

The different symptoms presented by cases are displayed in table 3. The incubation period ranged from 24 to 72 hours, with an average and median of 48 hours. Average duration of a PF episode was 4 days. Sixteen subjects (respectively 14) met the two other definitions of a PF episode, yielding incidence rates of 0.08 (0.07) cases per person-year.

Biological results

Antigenuria was negative for all subjects. The distribution of antibody titers, all *Legionella* species and SGs combined, is given in table 4. Up to antibody titers of 1/128, the distribution of PF cases and of non cases were similar. But subjects with titers of 1/256 had a greater probability to be a case compared to weaker titers (RR = 3.45; p = 0.12); the corresponding antibodies were anti-*Lp* SG 6 and anti-*L.gormanii*. On the other hand, it is noteworthy that 6 subjects who did not meet the definition criteria of PF had titers greater than 1/512 for antibodies anti-*Lp* SG6, anti-*L.jordanis*, anti-*L.micdadei*, anti-*L.dumoffii* and anti-*L.bozemanii*.

BMC Public Health 2006, 6:112 http://www.biomedcentral.com/1471-2458/6/112

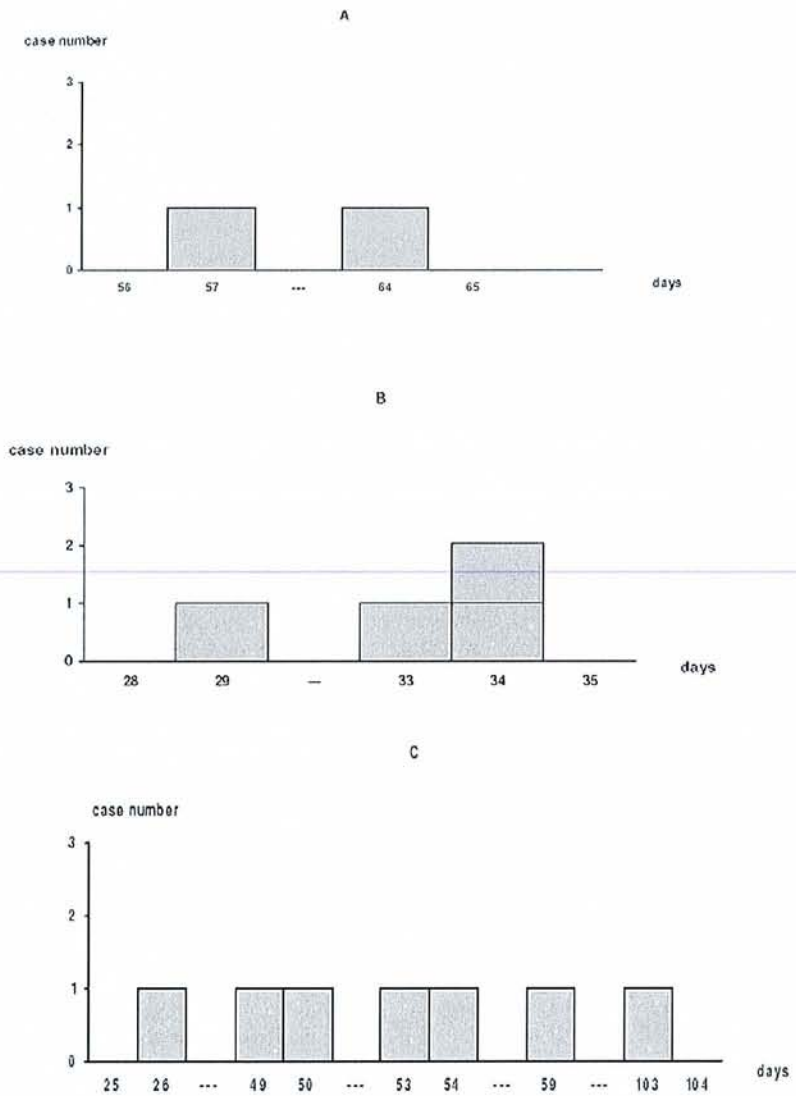


Figure 1
Time distribution of PF cases in the nursing homes were more than one case occurred. A, B and C represent the nursing homes were more than one case occurred. "days" represents the days (since the beginning of follow up) at which Pontiac fever symptoms occurred.

BMC Public Health 2006, 6:112 http://www.biomedcentral.com/1471-2458/6/112

Table 3: Frequency of the different symptoms exhibited by the subjects who met Pontiac fever definition.

Symptoms (in bold « major » symptoms)	Proportion of subjects (% among 24 episodes)
Vertigo	100%
Fever	73%
Cough	54%
Diarrhoea	31%
Headache	19%
Asthenia	19%
Myalgia	15%
Vomiting	7%
Shivers	4%
Nausea	7%
Sore throat	7%
Rhinorrhea	4%
Abdominal pain	4%

Detection of Legionella *in shower water*

Among the 23 subjects who presented at least one event defined as PF, *Legionella* have been detected in hot water of all the corresponding showers; they have also been found in the aerosol of 7 showers. Aerosolised *Legionella* was always associated with presence of bacteria in the water. Hence, only water contamination will be considered hereafter.

Lp was more frequent (66% of positive samples), with mainly *Lp* SGs 2 to 14. According to time of sampling (first flow or after draining) and to the run (first or second run, two days after), *Legionella* counts range from 5.10^3 to 2.10^7 CFU.L^{-1} of water (for culture) and from 9.10^3 to 15.10^7 cells.L^{-1} of water (for the FISH method). For both detection methods, water *Legionella* concentrations are significantly greater in the first flow than after draining ($p = 0.001$, paired test).

The association between PF incidence and shower water quality has been studied for different concentration thresholds, according to the analytical techniques that were used (two thresholds for the culture, and three for the FISH technique). Results (table 5) suggest that a contamination level measured by the FISH technique exceeding 10^4 *Legionella*.L^{-1} of water is associated with an increased risk of PF ($p = 0.04$). The rate of PF is also enhanced for greater contamination levels (RR= 1.83 [not significant] and 2.12 [$p = 0.05$], respectively for concentrations of 10^5 and 10^6 *Legionella*.L^{-1} detected by FISH). On the contrary, no statistically relevant association was observed between the levels of culturable *Legionella* and the PF incidence. This finding suggests a better sensitivity of the FISH technique to characterize exposure to infectious *Legionella*. When the two other definitions of a PF episode are accommodated, levels of 10^4 *Legionella*.L^{-1} of water assayed by the the FISH method are also associated with an increased incidence, although more weakly, with p values of 0.06 (fever associated or not with another symptom) and 0.08 (fever and another symptom) respectively.

Table 4: Distribution of antibody titers among cases and non cases of PF, and measure of association.

Antibody titers	Number of subjects with Pontiac fever	Number of subjects without Pontiac fever	RR (and p*)
1/16	5	94	1.39 (0.34)
1/32	2	39	1.27 (0.49)
1/64	3	77	0.94 (0.61)
1/128	2	24	2.08 (0.27)
1/256	2	14	3. 45 (0.12)
1/512	0	6	p = 0.78

* p value are from one-sided tests

Risk factors

Age, gender or medical history were not associated with incidence of PF, as defined in our study. The only factor that showed a statistically significant association with the "case" condition was immunosuppressive therapy (RR = 4.7, p = 0.02).

Discussion

This work proposes an operational definition of PF for surveillance and epidemiological investigation. The originality of this study is to lean not on an epidemic situation but on follow-up, during 4 months, of an elderly population residing in nursing homes. Taking a shower was the exposing activity. *Legionella* concentrations were measured both in hot-water and aerosols of showers, using culture and fluorescent in situ hybridisation (FISH) methods. The proposed definition of PF corresponds to the occurrence of at least one of the following "major" symptoms: headache, myalgia, fever or shivers, associated or not with other symptoms labelled as "minor". Such occurrence had to occur 24 to 48 hours after taking a shower contaminated with *Legionella*. The PF incidence is statistically increased when *Legionella* concentrations reach at least 10^4*Legionella*.L^{-1} in the shower water, using the FISH method, a level that seems to represent a threshold of risk. We are aware of no published epidemiological study on Legionnaires' disease that evaluated a minimal infective dose. However, a review of Legionnaire's episodes showed that whenever the probable source of contamination was found, water contained more than 10^5 CFU.L^{-1} [2]. Two other definitions of a Pontiac episode were explored that focussed on fever, associated or not with other symptoms; this sensitivity analysis did not alter the results.

ERRATUM

Une erreur s'est glissée dans le tableau 3, qui stipule l'apparition de vertiges chez 100% des sujets. En fait, la fréquence exacte d'apparition de vertiges chez les sujets est de 0%.

BMC Public Health 2006, 6:112 http://www.biomedcentral.com/1471-2458/6/112

Table 5: Cases distribution (and person-days at risk) for different levels of shower contaminations and associations' measure.

Contamination threshold	Exposure categories	Number of subjects with Pontiac fever (*person-days at risk*)	RR (and p*)
CFU ≥ 10^3 L^{-1}	Exposed	10 (*24855*)	1.30 (0.33)
	Unexposed	13 (*42001*)	
CFU ≥ 10^4 L^{-1}	Exposed	9 (*20928*)	1.41 (0.27)
	Unexposed	14 (*45928*)	
Cells-FISH ≥ 10^4 L^{-1}	Exposed	23 (*56245*)	UD** (0.02)
	Unexposed	0 (*10611*)	
Cells-FISH ≥ 10^5 L^{-1}	Exposed	19 (*48265*)	1.83 (0.19)
	Unexposed	4 (*18591*)	
Cells-FISH ≥ 10^6 L^{-1}	Exposed	11 (*20185*)	2.12 (0.05)
	Unexposed	12 (*46671*)	

*p value are from one-sided tests
**UD: undefined, because of 0 cases among unexposed
CFU: cells count by culture
Cells-FISH: cells count by FISH method

The description of PF in our study is unusual in several aspects: the study population and location, the source of the exposure and how it was ascertained.

Study population and epidemiologic particularities of the results

Our study describes for the first time, to our knowledge, the incidence of PF in a population of elderly people in nursing homes. Previous studies have described epidemic Pontiac episodes with spa (with jacuzzi), decorative fountains [2,5,6,13,26-28], in relation with cooling towers [4], and also among workers involved in cleaning activities with high pressure water in confined spaces [3,17,20,29]. In most studies, subjects (usually young and not living continuously in the setting where exposure took place) were exposed during a short period (generally not exceeding ten days) to a common source, a situation that facilitates linkage between a cluster of symptoms among several individuals and a common source of exposure. On the contrary, our study describes symptoms of PF among subjects who may be exposed iteratively and individually. In this "endemic" context, however, cases appeared on a grouped mode since, besides 10 sporadic cases, all others among 23 who met the case definition occurred on a short period among subjects belonging to three nursing homes. In reference to epidemiologic data available in the literature, the incidence rate calculated in this study expresses this particular context. Indeed, previous papers have described very high attack rates of PF, about 70 to 90% [1] in an epidemic setting. On the contrary, when PF episodes occur in the community in a non epidemic setting, the mild severity of the symptoms can lead to underestimation of true incidence, these banal symptoms being easily overlooked [5]; hence, in a population follow-up setting like in our study, data collection might well miss some cases.

Sera titers of 1/256 appear here as being linked to cases of PF with a relative risk of 3.5 (p = 0.12). Interestingly, this corresponds to the definition of the French National Institute of Health Surveillance (InVS) of a probable case of Legionnaires'disease [30]. Our results concerning the antigenuria (0 positive antigenuria for 23 subjects are similar to those described in some studies about legionellosis [3,10,20]. Six subjects who did not meet the proposed definition criteria of PF exhibited high titers of antibody (> 1/128), an intriguing observation. First, one should consider the small number of cases, allowing for sampling variability. This might also be explained by cross-reactions of antibodies detection in relation with the indirect immunofluorescence technique that is used. These cross-reactions are many and were described for mycobacteries, leptospires, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Citrobacter*, *Campylobacter* and *Coxiella burnetii* [31]. Moreover, *Legionella* encountered in human pathology generally belong to the *pneumophila* species. In our study, except Lp SG6, the other species observed among subjects with high levels of antibody who did not meet our definition of PF, belong to the non *pneumophila* species (anti-*L. jordanis*, anti-*L. micdadei*, anti-*L. dumoffii* and anti-*L. Bozemanii*). This also can be explained by the possibility of cross-reactions between different serogroups and different species of *Legionella* [32]. The most frequent symptoms that were exhibited by these subjects were cough (5/6), dyspnea (3/6), diarrhoea (3/6) and headaches (3/6). Although symptoms occurred in the three days following a shower, these subjects did not comply with our definition either because they only presented "minor symptoms", or because *Legionella* had not been detected in the showers they used.

In accord with other authors, age, gender and smoking habits are not found as risk factors for Pontiac fever [10,11]. This condition might even affect preferentially

young subjects, with typical ages among cases in published epidemics ranging between 30 to 40 years [3,4,10-13]. These figures are not comparable to ours since the average age of our elderly population among cases of PF was 82 years, similar to subjects who did not exhibit PF symptoms.

Among clinical risk factors that have been evaluated in the present study (a history of respiratory conditions, sicknesses impairing the immunity system such as diabetes, cancer, cardiovascular conditions and dementia such as Alzheimer's disease), only immunosuppressive therapy was associated with the incidence of PF ($p = 0.02$). This very risk factor had been also described in a study where prevalence of community respiratory conditions was compared between subjects residing in nursing homes and at home [33].

Source and measure of exposure

Aerosolised *Legionella* reached greater concentrations during the first minute, as previously described by several authors [34,35]. One limitation of this study resides in the semi-ecological character of exposure assessment. Indeed, exposure was not assessed at an individual level but by groups of subjects. All showers could not be systematically sampled and we assigned to a shower A (not sampled) the same quality as shower B (sampled) on criteria based on the existence of a common water column feeding the two showers. The resulting exposure misclassification is a Berkson type error [36,37]. It tends to lessen statistical power by increasing the variances estimates of the association; however it does not biase the point estimate, when the average group exposure is correctly represented by the measured concentrations.

Moreover, we have made the hypothesis that the hot-water *Legionella* contamination remained stable during the whole follow-up period. Now, only two measurements of water contamination were done at the end follow-up period in each nursing home to characterize exposure along the study. The validity of this assumption depends therefore on the time variability of the shower water contamination, whose avaluation is under way. It also depends upon other factors such that sensitivity and specificity of the sampling and analytical methods that were used [8,25]. Because the culture method has not the capacity to detect all viable bacteria that are sampled in the environment, due to their very diverse physiological states [38] and to environmental stress, conditions that led to the concept of "viable but not culturable bacteria" [39-41], there is some degree of underestimation of bacterial concentrations. Molecular approaches like the FISH technique might provide more representative concentration estimates, leading to improved exposure assessment to bacterial pathogens. Figures with the FISH method do not exist to date.

Conclusion

Our epidemiological findings back the operational definition of the PF that we propose. It needs to be confirmed by others studies. The investigation is still going on in order to include a thousand of volunteers, a number that should ensure a greater statistical power.

Abbreviations

PF : Pontiac fever

Lp: Legionella pneumophila

L. feeleii: Legionella feeleii

L. micdadei : micdadei

L. anisa: Legionella anisa

SG (s): serogroup (s)

anti-Lp: anti Legionella pneumophila

anti-L.: anti Legionella

AFNOR: Agence Française de Normalisation

FISH: Fluorescent In Situ Hybridisation

RR: Relative Risk

CDC: Center of Diseases Control

INVS: Institut National de Veille Sanitaire (National institute of Medical Surveillance)

MAS: Microbial Air Monitoring System

UFC: Colony-Forming Units

* Asterisked abbreviations are not defined in the body of the text

Financial and non-financial competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TP was involved in the epidemiological survey. He performed data statistical analysis and wrote the manuscript.

MAD carried out the environmental analyses (aerosols and water); she participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript.

DZN and HP designed and carried out the survey studies, participated in the data analysis and helped for drafting the manuscript.

LM conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript and revising it critically.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was funded by AFSSE (French Agency for Environemental Sanitary Security), the French ministry of Health and Véolia. M. Deloge-Abarkan was recipient of a doctoral scholarship from ADEME and EDF. The design of the aerosol exposure assessment was extensively discussed with Enric Robine, from CSTB, the French Building Research Center. The water system critical point analysis procedure was elaborated by Veolia Environnement. Nathalie Diguio, a Master student at Inserm, contributed to the study follow-up.

Participation to Lory MOUCHOT and Lahoucine BENAMGHAR to the statistical analysis is also acknowledged.

The authors are indebt towards the local medical authorities and the elderly persons who volunteered to participate to the study.

The staff of the nursing homes is also thanked; they cannot all be cited.

Brigitte Risse and Maryse Fiorani, from the Clinical Investigations Center of the Nancy University Hospital (coordinator: Anca Radauceanu) were responsible of the follow-up; their role was pivotal.

References

1. Pancer K, Stypulkowska-Misiurewicz H: **Pontiac fever – non-pneumonic legionellosis.** *Przegl Epidemiol* 2003, **57**:607-12.
2. Fields BS, Haupt T, Davis JP, Arduino MJ, Miller HP, Butler JC: **Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from whirlpool Spa: possible role of bacterial endotoxin.** *J Infect Dis* 2001, **184**:1289-92.
3. Castor ML, Wagstrom EA, Danila RN, Smith KE, Naimi TS, Besser JM, Peacock KA, Juni BA, Hunt JM, Bartkus JM, Kirkhorn SR, Lynfield R: **An outbreak of Pontiac fever with respiratory distress among workers performing high-pressure cleaning at a sugar-beet processing plant.** *J Infect Dis* 2005, **191**:1530-37.
4. Mori M, Hoshino K, Sonoda H, Yoshida H, Yabuuchi E, Yamashiro Y, Koide M, Saito A, Kishimoto T, Furuhata K: **An outbreak of Pontiac fever due to *Legionella pneumophila* serogroup 7. I. clinical aspects.** *Kansenshogaku Zasshi* 1995, **69**:646-53.
5. Jones TF, Benson RF, Brown EW, Rowland JR, Crosier SC, Schaffner W: **Epidemiologic investigation of a restaurant-associated outbreak of Pontiac fever.** *Clinical Infectious Diseases* 2003, **37**:1292-7.
6. Benin AL, Benson RF, Arnold KE, Fiore AE, Cook PG, Williams LK, Fields B, Besser RE: **An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States.** *J Infect Dis* 2002, **185**:237-43.
7. Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H: **Epidémiologie et pouvoir pathogène de *Legionella*.** In *Bacteriologie Clinique* Edited by: Ellipses. Paris; 1992:309-18.
8. Bornstein N, Fleurette J: ***Legionella*.** In *Manuel de bactériologie clinique* Edited by: Elsevier. Paris; 1994:1061-87.
9. Fraser DW, Deubner DC, Hill DL, Gilliam DK: **Nonpneumonic, short-incubation-period Legionellosis (Pontiac fever) in men who cleaned a steam turbine condenser.** *Science* 1979, **205**:690-1.
10. Friedman S, Spitalny K, Barbaree J, Faur Y, Mckinney R: **Pontiac fever outbreak associated with a cooling tower.** *Am J Public Health* 1987, **77**:568-72.
11. Goldberg DJ, Wrench JG, Collier PW, Emslie JA, Fallon RJ, Forbes GI, McKay TM, Macpherson AC, Markwick TA, Reid D: **Lochgoilhead fever: outbreak of non-pneumonic legionellosis due to *Legionella micdadei*.** *Lancet* 1989, **1**:316-8.
12. Cordes LG, Fraser DW: **Legionellosis: Legionnaires' disease; Pontiac fever.** *Med Clin North Am* 1980, **64**:395-416.
13. Fenstersheib MD, Miller M, Diggins C, Liska S, Detwiler L, Werner SB, Lindquist D, Thacker WL, Benson RF: **Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*.** *Lancet* 1990, **336**:35-7.
14. Kaufmann AF, Mcdade JE, Patton CM, Bennett JV, Skaliy P, Feeley JC, Anderson DC, Potter ME, Newhouse VF, Gregg MB, Brachman PS: **Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission.** *Am J Epidemiol* 1981, **114**:337-47.
15. Luttichau HR, Vinther C, Uldum SA, Moller J, Faber M, Jensen JS: **An outbreak of Pontiac fever among children following the use of a whirlpool.** *Clin Infect Dis* 1998, **26**:1374-8.
16. Miller LA, Beebe JL, Butler JC, Martin W, Benson R, Hoffman RE, Fields BS: **Use of polymerase chain reaction in an epidemiologic investigation of Pontiac fever.** *J Infect Dis* 1993, **168**:769-72.
17. Herwaldt LA, Gorman GW, McGrath T, Toma S, Brake B, Hightower AW, Jones J, Reingold AL, Boxer PA, Tang PW: **A new *Legionella* species, *Legionella feeleii* species nova, causes Pontiac fever in an automobile plant.** *Ann Intern Med* 1984, **100**:333-8.
18. Hunt DA, Cartwright KA, Smith MC, Middleton J, Bartlett CL, Lee JV, Dennis PJ, Harper D: **An outbreak of Legionnaires' disease in Gloucester.** *Epidemiol Infect* 1991, **107**:133-41.
19. Thacker SB, Bennett JV, Tsai TF, Fraser DW, Mcdade JE, Shepard CC, William KH Jr, Stuart WH, Dull HB, Eickhoff TC: **An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium.** *J Infect Dis* 1978, **138**:512-9.
20. Gregersen P, Grunnet K, Uldum SA, Andersen BH, Madsen H: **Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry.** *Scand J Work Environ Health* 1999, **25**:291-5.
21. U.S. EPA (United States Environnemental Protection Agency): **Exposure Factors Handbook.** [http://www.epa.gov/NCEA/pdfs/efh/sect15a.pdf].
22. Amann R, Ludwig W, Schleifer K-H: **Philogenetic Identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological.** *Reviews* 1995, **59**:143-169.
23. Grimm D, Merkert H, Ludwig W, Schleifer K-H, Hacker J, Brand BC: **Specific detection of *Legionella pneumophila* : construction of a new 16S rRNA-Targeted oligonucleotide probe.** *Applied and Environmental Microbiology* 1998, **64**:2686-90.
24. AFNOR (Association Française de Normalisation): **Qualité des eaux. Recherche et dénombrement des *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila*, méthode générale par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.** *AFNOR Report no* :T90-431.
25. Buchbinder S, Trebesius K, Heesemann J: **Evaluation of detection of *Legionella spp.* in water samples by fluorescence in situ hybridation, PCR amplification and bacterial culture.** *International Journal of Medical Microbiology* 2002, **292**:241-5.
26. Mangione EJ, Remis RS, Tait KA, McGee HB, Gorman GW, Wentworth BB, Baron PA, Hightower AW, Barbaree JM, Broome CV: **An outbreak of Pontiac fever related to whirlpool use, Michigan 1982.** *JAMA* 1985, **253**:535-9.
27. Gotz HM, Tegnell A, De Jong B, Broholm KA, Kuusi M, Kallings I, Ekdahl K: **A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden.** *Epidemiol Infect* 2001, **126**:241-7.
28. Spitalny KC, Vogt RL, Orciari LA, Witherell LE, Etkind P, Novick LF: **Pontiac fever associated with a whirlpool spa.** *Am J Epidemiol* 1984, **120**:809-17.
29. Armstrong CW, Miller GB Jr: **A 1949 outbreak of Pontiac fever-like illness in steam condenser cleaners.** *Arch Environ Health* 1985, **40**:26-9.

30. Campese C, Che D, Maine C, Jarraud S, Bitard D: **Les légionelloses déclarées en France en 2004.** *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH) no.26/2005* .
31. Bornstein N, Fleurette J, Bosshard S, Bouvet C, Thouvenot D, Aymard M: **Evaluation of the incidence of serological cross reactions between *Legionella* and *Mycoplasma* or *Chlamydia*.** *Pathol Biol* 1984, **32**:165-8.
32. Lo Presti F, Riffard S, Meugnier H, Reyrolle M, Lasne Y, Grimont PA, Grimont F, Vandenesch F, Etienne J, Fleurette J, Freney J: ***Legionella taurinensis* sp. nov., a new species antigenically similar to *Legionella spiritensis*.** *Int J Syst Bacteriol* 1999, **49**:397-403.
33. Martinez-Moragon E, Garcia Ferrer L, Serra Sanchis B, Fernandez Fabrellas E, Gomez Belda A, Julve Pardo R: **Community-acquired pneumonia among the elderly: differences between patients living at home and in nursing homes.** *Arch Bronconeumol* 2004, **40**:547-52.
34. Dennis PJ, Wright AE, Rutter DA, Death JE, Jones BP: ***Legionella pneumophila* in aerosol from shower baths.** *J Hyg (Lond)* 1984, **93**:349-53.
35. Breiman RF, Fields BS, Sanden GN, Volmer L, Meier A, Spika JS: **Association of shower use with Legionnaires' disease. Possible role of amoebae.** *JAMA* 1990, **263**:2924-26.
36. Steeland K, Deddens JA: **Design and analysis of studies in environmental epidemiology.** In *Topics in environmental epidemiology* New York, Oxford: Oxford University Press; 1997:9-27.
37. Künzli N, Tager IB: **The semi-individual study in air pollution epidemiology: a valid design as compared to ecologic studies.** *Envir Health Perspect* 1997, **105**:1078-83.
38. Maul A, Vagost D, Block JC: **Microbiologie des réseaux de distribution.** In *Stratégie d'échantillonnage pour analyse microbiologique sur réseaux de distribution* Edited by: Lavoisier. Paris; 1998:1-21.
39. Federighi M: **Les formes viables non cultivables des bactéries: point de vue et retour d'expérience d'un hygiéniste.** *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 2004, **19**:237-44.
40. Colwell RR, Grimes DJ: *Nonculturable microorganisms in the environment* Washington, DC: American Society for Microbiology; 2000.
41. Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR, Barer MR: **Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues.** *Antonie van Leeuwenhoek* 1998, **73**:169-87.
42. Bonnard R: **Le risque biologique et la méthode d'évaluation du risque – Rapport final.** *Unité d'Evaluation des Risques Chroniques* 2001 [http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/etud_impact/risqbio_si72.pdf].

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

http://www.biomedcentral.com/1471-2458/6/112/prepub

En conclusion, l'analyse des données sur une partie de l'effectif de personnes âgées a permis de proposer une définition d'un cas de fièvre de Pontiac qui intègre à la fois des données cliniques et métrologiques. Les critères cliniques retenus sont la survenue dans les trois jours suivant la prise de douche d'un signe majeur minimum associés ou non à des signes mineurs.

- Les signes majeurs sont : céphalées, myalgies, fièvre ou frissons.
- Les signes mineurs issus de la littérature sont les suivants : vomissement, toux, vertiges, diarrhée ou asthénie.

La durée de l'épisode doit être comprise entre 2 et 8 jours.

Enfin, *Legionella*, à l'origine de l'infection, doit être mesurée dans l'eau et/ou dans l'aérosol de l'eau des douches du patient considéré.

4.2 INCIDENCE DE LA FIEVRE DE PONTIAC

L'article présenté ci-dessus a permis de proposer une définition de la fièvre de Pontiac basée sur une partie de l'effectif (560 personnes âgées). L'étude épidémiologique achevée sur plus de huit cents personnes âgées, il est intéressant de conforter les données obtenues sur la totalité de l'effectif ; ce dont les paragraphes suivants se proposent de faire.

4.2.1 Présentation des cas de fièvre de Pontiac

Pour un effectif de 828 personnes âgées participantes à l'étude épidémiologique, la définition clinique d'une fièvre de Pontiac a permis de mettre en évidence 33 épisodes de cette forme clinique pour 32 personnes : une personne a réalisé 2 épisodes de fièvre de Pontiac.

Toutefois, chaque épisode est considéré comme une fièvre de Pontiac à la condition majeure que la bactérie *Legionella*, source de l'infection, ait été détectée dans l'eau chaude et/ou dans l'aérosol des douches. Cette détection est réalisée à l'aide de deux techniques d'analyse : la culture et l'hybridation *in situ* (FISH) (chapitre 2, § 6).

L'analyse de l'exposition des 32 personnes-cas s'est révélée positive seulement pour 29 personnes ; pour 3 cas, la bactérie *Legionella* n'a été détectée ni dans l'eau ni dans l'air (Tableau 5.5).
Par ailleurs, pour 11/29 cas (37,9%) de fièvre de Pontiac, la bactérie *Legionella* a été mesurée à la fois dans la matrice eau et dans l'aérosol.

Tableau 5. 5 : Exposition à Legionella des personnes âgées répondant à la définition clinique de fièvre de Pontiac (n=32).

Exposition	**EAU CHAUDE**		**AEROSOL**
Mesure	***Legionella* cultivables**	***Legionella*-FISH**	***Legionella*-FISH**
Points de douche positifs (%) [1]	11/32 (34,4%)	29/32 (90,6%)	11/32 (34,4%)

[1] un échantillon est dit positif quand la concentration en *Legionella* est supérieure à la limite de détection.

Les 29 cas de fièvre de Pontiac suivent les caractéristiques observées pour l'ensemble des participants, à savoir 2/3 de femmes et un âge moyen de 82 ans (± 9,3 ans).

4.2.2 Caractéristiques cliniques des cas de fièvre de Pontiac

L'état clinique des 29 personnes-cas fièvre de Pontiac est évalué au travers (i) de l'apparition de signes cliniques évocateurs de la fièvre de Pontiac au cours de l'épisode de légionellose bénigne et ; (ii) de dosages d'antigènes urinaires anti-*L. pneumophila* SG1 et ; (iii) de dosages sanguins de 18 anticorps anti-*Legionella*.

Le tableau 5.6 montre que le signe clinique le plus fréquemment observé chez les 29 cas pendant les épisodes de fièvre de Pontiac est un des quatre signes majeurs de la définition de la pathologie : la fièvre pour 75,9% des cas. Quant à la prévalence des trois autres signes majeurs (frissons, myalgies ou céphalées), elle est comprise entre 6,9% et 17,2% des cas de fièvre de Pontiac. Les signes mineurs les plus observés, caractérisant la fièvre de Pontiac, sont la toux (44,8%) et la diarrhée (27,6%). La fréquence d'apparition des signes cliniques chez les personnes cas conforte la première analyse (publication, §4.1 de ce chapitre) réalisée sur une partie de cet effectif. En effet, la fréquence d'apparition des signes cliniques n'est pas statistiquement différente quel que soit l'effectif de la population âgée analysé. Le nombre de signes cliniques apparus, pendant les épisodes de fièvre de Pontiac, pour l'ensemble des cas est de 2,1 (±0,8) (médiane = 2). Seules deux personnes présentent un maximum de 4 signes cliniques, au cours de l'épisode de fièvre de Pontiac.

Tableau 5. 6 : Signes cliniques observés chez les 29 cas de fièvre de Pontiac au cours des épisodes.

Signe clinique	Nombre de cas ayant présenté le signe ; n (%)
Fièvre*	22 (75,9%)
Toux	13 (44,8%)
Diarrhée	8 (27,6%)
Céphalées*	5 (17,2%)
Asthénie	4 (13,8%)
Myalgies*	4 (13,8%)
Vomissements	3 (10,3%)
Frissons*	2 (6,9%)
Agitation	1 (3,4%)
Douleurs abdominales	1 (3,4%)

* Signe majeur de la définition clinique de fièvre de Pontiac

Pour les 29 cas de fièvre de Pontiac, comme pour l'ensemble de la population d'étude, les dosages d'antigénurie urinaire anti-*L. pneumophila* SG.1 se sont révélés négatifs.

Le dosage des anticorps dirigés contre 18 espèces de *Legionella*, considérés comme marqueurs biologiques d'exposition, a été possible pour seulement 23/29 cas de fièvre de Pontiac du fait d'une déficience et/ou d'un mauvais état de leur capital veineux. Dans une première approche de l'analyse de l'état immunitaire des cas de fièvre de Pontiac, seul le titre d'anticorps le plus élevé parmi les 18 espèces de *Legionella* testées a été pris en compte.

Le tableau 5.7 montre que pour les deux tiers des personnes, ayant présenté un épisode de fièvre de Pontiac au cours des 4 mois de suivi épidémiologique, aucun anticorps n'a été détecté quelle que soit l'espèce recherchée. Seules 2 personnes présentent un titre d'anticorps positif au 1/256 : pour une personne, il est dirigé contre l'espèce *L. gormanii* et pour l'autre, il est dirigé contre l'espèce *L. pneumophila* SG.6.

Tableau 5. 7 : Prévalence des titres d'anticorps, toute espèce de Legionella confondue chez 23 cas cliniques de fièvre de Pontiac.

Titre maximum des sérums[1]	Nombre de cas n (%)
Inférieur à la LD	16 (69,6%)
Positif au 1/16	7 (30,4%)
Positif au 1/32	4 (17,4%)
Positif au 1/64	4 (17,4%)
Positif au 1/128	2 (8,7%)
Positif au 1/256	2 (8,7%)
Positif au 1/512	0 (0 %)

[1] Seul le titre en anticorps le plus élevé parmi les 18 dosages est considéré ; LD = limite de détection.

Lors de la première analyse des données réalisée sur plus de cinq cents personnes âgées (publication, §4.1 de ce chapitre), les effectifs des cas ayant des titres positifs en anticorps (indépendamment du seuil) sont semblables à ceux de l'effectif total présentés dans le tableau ci-dessus. Seule la proportion de cas ayant des titres inférieurs à la limite de détection est augmentée passant de 50% à 69%.

4.2.3 Epidémiologie de la fièvre de Pontiac

Pour ces 29 personnes âgées-cas fièvre de Pontiac, la durée moyenne d'un épisode de 3,5 jours (84 heures) et la durée moyenne de la période d'incubation est de 2,1 jours (51 heures).

En tenant compte de la durée exacte de participation à l'étude, la densité d'incidence de la fièvre de Pontiac, pour la totalité de l'effectif, est de 0,11 cas/personne.an (I.C. 95% : 0,07-0,15). Cette densité est équivalente à celle obtenue dans la première analyse sur plus de cinq cent personnes âgées (0,125 cas/personne.an). En outre, le taux d'incidence (ou incidence cumulée) est de 3,6% (30 épisodes pour 828 personnes à risque) pour une période de quatre mois de suivi.

Une personne est dite exposée à *Legionella*, si la bactérie est mesurée soit dans l'eau soit dans l'aérosol, et ce, quelle que soit la technique d'analyse (culture ou hybridation *in situ*). De ce fait, 691 personnes (83,5%) ont été exposées à *Legionella*. Avec 30 épisodes, le taux d'attaque de la fièvre de Pontiac est de 4,3% dans notre étude. Les 29 personnes âgées ayant répondu à la définition de la fièvre de Pontiac sont réparties dans 16 des 34 maisons de retraite de l'étude. Parmi ces personnes, 12 (41,4%) sont des cas isolés et donc sporadiques dans leur établissement, tandis que les 17 autres cas se sont produits de manière groupée dans 4 maisons de retraite différentes. Par rapport à ce qui est décrit dans la publication (§4 .1), l'analyse de la totalité de l'effectif de personnes âgées a permis de mettre en évidence 4 cas groupés de fièvre de Pontiac supplémentaires au sein d'une maison de retraite (Figure 5.6).

En conclusion, les cas groupés de fièvre de Pontiac ont été répertories dans 4 établissements : au sein de 2 maisons de retraite, 4 cas de fièvre de Pontiac ont été diagnostiqués ; pour les 2 autres maisons de retraite, il y a eu respectivement 2 cas et 7 cas groupés de fièvre de Pontiac (§4.1 de ce chapitre).

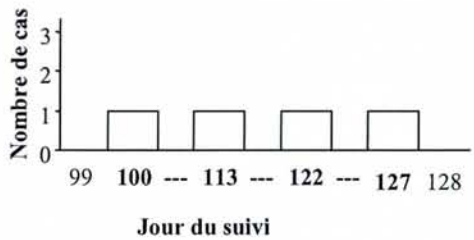


Figure 5. 6 : Courbe épidémique des 4 cas groupés de fièvre de Pontiac diagnostiqués dans une maison de retraite auxquels s'ajoutent les cas décrits par Tossa et al. [2006].

Les 17 cas groupés de fièvre de Pontiac dans 4 maisons de retraite sont aussi agrégés dans une séquence temporelle relativement courte. En effet, l'intervalle de temps entre la survenue de deux cas de fièvre de Pontiac est compris entre 1 et 44 jours (Figure 5.6 et §4.1 de ce chapitre). Par ailleurs, la survenue de plusieurs cas de fièvre de Pontiac au cours de la même période n'a été observée qu'au sein d'une maison de retraite et ce pour deux personnes.

5 DISCUSSION

Les éléments développés dans ce chapitre ont permis : (i) de présenter le contexte de l'étude épidémiologique menée dans une trentaine de maisons de retraite lorraine ainsi que la population d'étude ; (ii) de proposer une définition opérationnelle de la fièvre de Pontiac afin (iii) d'évaluer son incidence au sein d'une population âgée. Plus de huit cents personnes âgées résidant dans 34 maisons de retraite de Lorraine, ont participé à l'étude et ont été suivies sur une période de 4 mois.

5.1 SINGULARITES DE LA RECHERCHE ET DE LA POPULATION ETUDIEE

La particularité de cette étude est le suivi clinique, pendant 4 mois, d'une population de personnes âgées résidant dans des maisons de retraite : elle ne s'appuie pas sur une situation à caractère épidémique. La prise de douche est l'élément exposant à *Legionella*, bactérie mesurée à la fois dans l'eau et dans l'aérosol.

Neuf pourcent des maisons de retraite de Lorraine ont participé à l'étude et sont localisées dans l'ensemble des quatre départements de la région. L'historique des contaminations éventuelles en légionelles au sein des maisons de retraite participantes n'a pas été vérifié au préalable, ce n'était donc pas des critères de sélection des établissements d'étude.

La recherche des antigènes urinaires de *L. pneumophila* SG.1 s'est révélée négative pour l'ensemble de la population d'étude. Cette analyse est spécifique d'une infection récente (l'antigène urinaire disparaît quelques semaines après le contact avec la bactérie [Kohler *et al.*, 1984]) qu'il est difficile de capter dans une étude de prévalence ; ce qui pourrait expliquer cette négativité des résultats. Rappelons aussi que le dosage est uniquement spécifique à la recherche de l'antigène dirigé contre *L. pneumophila* SG1 ce qui restreint considérablement le champ d'investigation d'une éventuelle infection.

D'autre part, les dosages sérologiques des titres d'anticorps anti-*Legionella* ont ciblé 18 espèces de *Legionella*. Pour plus de 88% de la population âgée, tous les titres d'anticorps anti-*Legionella* recherchés sont inférieurs à la limite de détection. Les anticorps les plus fréquemment détectés, dans notre population d'étude, sont dirigés contre des *L. pneumophila*, plus précisément contre le sérogroupe 6 (11,3%), le sérogroupe 5 (11,1%) et le sérogroupe 3 (7,1%).
Les anticorps anti-*Legionella* ont été majoritairement détectés à des titres faibles : 28% positifs au 1/16ème, 20% positifs au 1/32ème et 17% positifs au 1/64ème. A notre connaissance, il n'existe pas de données bibliographiques sur la prévalence des titres faibles en anticorps dans la population âgée dans un contexte non épidémique. Les quelques études disponibles ont été réalisées sur des populations saines (donneurs de sang, résidents) et présentent une séroprévalence en titres faibles de 10 à 100 fois plus faible [Heudorf *et al.*, 2002 ; Franzin et Scramuzza, 1995 ; Borobio *et al.*, 1987 ; Bornstein *et al.*, 1986 ; Storch *et al.*, 1979]. A titre d'exemple, les études sur des donneurs de sang montrent une prévalence d'anticorps anti-*Legionella*, positifs au 1/16 ou 1/32, de 0,3% [Franzin et Scramuzza, 1995], 1,2% [Borobio *et al.*, 1987] ou 2,5% [Bornstein *et al.*, 1986]. Les spécificités de notre population d'étude, notamment au niveau de l'âge et des antécédents médicaux pourraient expliquer cette différence de séroprévalence entre notre étude et la littérature, mais il faudrait réaliser d'autres travaux pour corroborer ou non cette hypothèse.
Concernant la prévalence des titres élevés en anticorps, seules 3% des personnes âgées ont des titres $\geq$ 1/256. Seule une étude s'est intéressée à la séroprévalence des titres élevés en anticorps dans la population âgée dans un contexte non épidémique [Boldur *et al.*, 1986] : sur près de 200 personnes âgées, 15,5% présentaient des titres de sérum positifs au 1/256ème. Mais les auteurs précisent que les personnes âgées étaient dans un état de santé très faible et que certaines d'entre elles avaient subi plusieurs hospitalisations, ce qui peut expliquer pourquoi la séroprévalence des titres élevés était plus importante que dans notre étude.

5.2 Definition d'un Cas de Fievre de Pontiac

Le point fort de ce chapitre est de proposer une définition opérationnelle de cas de fièvre de Pontiac sur les données complètes de l'étude. Elle est basée à la fois sur des critères cliniques et métrologiques. Les critères cliniques retenus sont la survenue dans les trois jours suivant la prise de douche d'un signe majeur minimum associés ou non à des signes mineurs.

Les signes majeurs sont : céphalée, myalgie, fièvre ou frissons. Les signes mineurs issus de la littérature sont les suivants : vomissement, toux, vertige, diarrhée ou asthénie. La durée de l'épisode doit être comprise entre 2 et 8 jours ; 1 jour en cas d'antibiothérapie. Sur le plan métrologique, *Legionella*, à l'origine de l'infection, doit être mesurée dans l'eau et/ou dans l'air des douches étudiées.

Il s'agit d'une avancée importante puisque la pathogenèse de cette maladie est mal connue car moins de vingt épidémies ont été décrites depuis 40 ans sans doute par le manque de systèmes de surveillance adaptés. Les symptômes cliniques décrits jusqu'alors, hétérogènes suivant les études, sont ceux d'un banal syndrome pseudo-grippal : nausées, myalgies, fièvre, frissons, maux de tête, toux, troubles de la mémoire et de la concentration [Castor *et al.*, 2005 ; Huhn *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003 ; Benin *et al.*, 2002 ; Fields *et al.*, 2001 ; Götz *et al.*, 2001 ; Gregersen *et al.*, 1999 ; Lüttichau *et al.*, 1998 ; Golberg *et al.*, 1989 ; Friedman *et al.*, 1987 ; Herwaldt *et al.*, 1984 ; Spitalny *et al.*, 1984 ; Fraser *et al.*, 1979 ; Glick *et al.*, 1978]. Même si aucune définition clinique unique n'existe à ce jour, notre travail a permis de donner pour la première fois une définition d'un épisode de Pontiac associant clinique et métrologie.

Notre définition de la fièvre de Pontiac ne prend pas en compte l'état immunitaire des personnes et aucune relation entre taux d'anticorps et épisode de Pontiac n'a pu être observée. La littérature est contradictoire à se sujet. En effet, pour certains auteurs, la fièvre de Pontiac développe les mêmes critères sérologiques que la maladie du Légionnaire dans des contextes épidémiques [Friedman *et al.*, 1987 ; Hunt *et al.*, 1991]. D'autres prétendent au contraire que la sérologie lors d'une fièvre de Pontiac est inconstamment positive [Thacker *et al,*. 1978] ce qui est d'ailleurs le cas dans notre étude se situant dans un contexte non épidémique. L'état de l'art concernant l'antigénurie est tout aussi contradictoire ; rappelons qu'aucune antigénurie positive n'a été observée lors de notre étude. La présence d'antigènes urinaires semble positive de manière inconstante, même pour des épidémies reliées à *L. pneumophila* SG.1 : aucune antigénurie positive pour 5 cas [Gregersen *et al.*, 1999], 2 antigénuries positives sur 16 cas [Friedman *et al.*, 1987]. D'autres études ont montré aussi l'absence totale d'antigénurie positive lors d'épidémies de fièvre de Pontiac [Castor *et al.*, 2005 ; Gregersen *et al.*, 1999 ; Friedman *et al.*, 1987].

5.3 Incidence de La Fievre de Pontiac Chez les Personnes Agees

L'étude a permis de diagnostiquer 30 épisodes de fièvre de Pontiac développés par 29 personnes âgées, soit une densité d'incidence de 0,11 cas/personne.an (I.C. 95% : 0,07-0,15). Aucune autre étude n'a évalué l'incidence de fièvre de Pontiac dans une population de personnes âgées résidant en maison de retraite, dans un contexte non épidémique.

En effet, les études antérieures décrivent des épisodes épidémiques de fièvre de Pontiac en rapport soit avec des séjours dans des hôtels (station thermale avec jacuzzi, fontaines décoratives) [Benin *et al.*, 2002 ; Fields *et al.*, 2001 ; Fenstersheib *et al.*, 2001 ; Gotz *et al* ., 2001 ; Spitalny *et al.*, 1984 ; Mangione *et al.*, 1985], soit avec des restaurants (fontaines décoratives) [Jones *et al.*, 2003], soit avec des installations industrielles (tours aéro-réfrigérante) [Mangione *et al.*, 1985] soit enfin chez des employés travaillant à des postes de nettoyage avec du jet d'eau à haute pression dans des espaces confinés [Castor *et al.*, 2005 ; Gregersen *et al.*, 1999 ; Herwaldt *et al.*, 1984].

Le taux d'incidence de la fièvre de Pontiac est de 3,6%. Avec 30 épisodes, le taux d'attaque de la fièvre de Pontiac, dans notre étude, est de 4,3%. En référence aux données disponibles dans la littérature, le taux d'incidence calculé dans cette étude traduit le contexte épidémiologique particulier. En effet, les travaux antérieurs rapportent des taux d'attaque de fièvre de Pontiac élevés, de 11 à 94% qui ont été obtenus dans le cadre d'investigations menées suite à des épidémies de fièvre de Pontiac [Huhn *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003 ; Benin *et al.*, 2002 ; Fields *et al.*, 2001 ; Götz *et al.*, 2001 ; Miller *et al.*, 1993 ; Fenstersheib *et al.*, 1990 ; Friedman *et al.*, 1987 ; Herwaldt *et al.*, 1984 ; Glick *et al.*, 1978]. Il est alors difficile de comparer rigoureusement ces données aux nôtres compte tenu des différences de population et d'exposition. En effet, par définition, une épidémie correspond à une exposition aiguë donc *a priori* limitée dans le temps, d'intensité forte en terme d'exposition (contamination en légionelles sans doute importante, mais pas toujours reportée dans les travaux) et sur une population exposée plus restreinte. Or, nous nous situons tout à l'inverse de cette situation, et notamment, la contamination des réseaux d'eau en *Legionella* des établissements n'était pas connue au moment de l'inclusion des volontaires. Ainsi, l'évaluation de l'incidence de la fièvre de Pontiac, telle qu'elle a été réalisée reflète plutôt un bruit de fond de la fièvre de Pontiac au sein d'une population sensible. Par ailleurs, la bénignité des troubles associés aux épisodes de fièvre de Pontiac peut occasionner une sous-estimation de l'incidence. En effet, ces troubles d'apparence banale peuvent passer inaperçus [Jones *et al.*, 2003] et donc ne pas être renseignés sur le registre de recueil de données mis en place dans notre étude. Nous avons quand même pris la précaution de renseigner toute éventuelle épidémie intercurrente de grippe au sein de chaque établissement au cours des suivis ; aucune épidémie de grippe n'a d'ailleurs jamais été observée.

En conclusion, la définition opérationnelle de la fièvre de Pontiac a permis de la diagnostiquer chez 29 personnes âgées. Les caractéristiques générales, les signes cliniques ainsi que l'état immunitaire de ces personnes ont été présentés. Toutefois, il serait intéressant de comparer ces caractéristiques à la population générale afin d'identifier d'éventuels facteurs favorisant la fièvre de Pontiac au sein des personnes âgées ; ce sera l'objet du chapitre suivant.

6

EVALUATION DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC

Sommaire

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 194

2 EVALUATION DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC : APPROCHE BIOLOGIQUE 195

2.1 FACTEURS FAVORISANTS 195

2.2 ANALYSE DES MARQUEURS D'EXPOSITION 196

3 CARACTERISATION DE L'EXPOSITION A *LEGIONELLA* 198

3.1 PRESENTATION DES DONNEES 198

3.1.1 Milieu EAU 199

3.1.2 Milieu AIR 199

3.2 PLAN D'ANALYSE DES DONNEES 199

3.2.1 Hypothèses d'exposition à *Legionella* présente dans l'eau chaude 200

3.2.2 Hypothèses d'exposition à *Legionella* présente dans les aérosols de douche 201

4 EVALUATION DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC : APPROCHE ENVIRONNEMENTALE ... 201

4.1 EXPOSITION BASEE SUR LES TENEURS DE *LEGIONELLA* DANS L'EAU 201

4.1.1 Evaluation du Risque en fonction des concentrations en *Legionella* cultivables 201

4.1.2 Evaluation du Risque en fonction des concentrations en *Legionella* hybridées (FISH) 202

4.2 ETABLISSEMENT D'UNE RELATION DOSE-EFFET SUR L'EAU CHAUDE 203

4.2.1 Dose = *Legionella* cultivables 204

4.2.2 Dose = *Legionella* détectées avec la technique FISH 204

4.3 EXPOSITION AUX AEROSOLS DE *LEGIONELLA* 205

4.3.1 Evaluation du Risque de Fièvre de Pontiac chez les cas 205

4.3.2 Evaluation du Risque de fièvre de Pontiac chez les cas exposés à *Legionella* aéroportée 206

5 DETERMINATION DES FACTEURS DE RISQUE DE LA FIEVRE DE PONTIAC 207

5.1 RAPPEL DES DONNEES 207

5.2 FACTEURS DE RISQUE DE LA FIEVRE DE PONTIAC 207

6 DISCUSSION 209

6.1 FACTEURS DE RISQUE BIOLOGIQUES DE LA FIEVRE DE PONTIAC 209

6.1.1 Antécédents médicaux 209
6.1.2 Age, genre et pratiques tabagiques 209
6.2 SEROPREVALENCE DES ANTICORPS CHEZ LES CAS-FIEVRE DE PONTIAC 210
6.3 LIEN ENTRE EXPOSITION A *LEGIONELLA* ET FIEVRE DE PONTIAC 211

A partir des données de l'étude épidémiologique réalisée au sein des maisons de retraite de Lorraine, l'objectif de ce chapitre est d'identifier et de quantifier les facteurs de risque de la fièvre de Pontiac chez les personnes âgées, afin de disposer d'un modèle de prédiction du risque de la fièvre de Pontiac. La finalité de ce chapitre est d'apporter des éléments de réponses quant au risque légionelles en établissant des liens entre le diagnostic de fièvre de Pontiac et les niveaux de légionelles dans l'eau et dans les aérosols. Ces niveaux à risque sont comparés aux seuils actuels de gestion du risque légionelles.

1 CONTEXTE DE L'ETUDE

Actuellement, les facteurs de risque de la fièvre de Pontiac sont mal définis et contradictoires d'une étude à l'autre. Par exemple, pour certains, le tabagisme favorise la fièvre de Pontiac [Huhn *et al.*, 2005 ; Götz *et al.*, 2001] et pour d'autres, n'a aucune influence [Benin *et al.*, 2002 ; Friedman *et al.*, 1987 ; Mangione *et al.*, 1982]. De même, certains font référence aux antécédents médicaux en précisant qu'ils ne constituent pas de facteurs de risque de la fièvre de Pontiac [Benin *et al.*, 2002], alors que d'autres n'y font aucune référence [Lüttichau *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 1983].

Dans le chapitre précédent, nous avons évalué la densité d'incidence de la fièvre de Pontiac dans la population d'étude : 0,11 cas/personne.an (I.C. 95% : 0,07-0,15), correspondant à 30 épisodes épidémiques développés par 29 personnes âgées au cours des quatre mois de suivi. Par ailleurs, les signes cliniques développés par les 828 personnes âgées ainsi que leur état immunitaire ont été présentés. Les personnes âgées atteintes de fièvre de Pontiac ont été exposées à *Legionella* aux points de douche, qui ont été retrouvées pour certaines, à la fois dans l'eau et dans l'aérosol.
Il est également intéressant de comparer les caractéristiques, antécédents et niveaux d'exposition à *Legionella*, entre les cas de fièvre de Pontiac et la population non atteinte afin d'identifier d'éventuels facteurs de risque favorisant la fièvre de Pontiac chez les personnes âgées.
Concernant l'exposition à l'agent pathogène, aucune étude ne propose un seuil critique de *Legionella*. En France, la réglementation, élaborée de manière empirique, impose une valeur de gestion du risque de 10^3 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau [DGS, 2002] sans pour autant avoir défini un niveau sanitaire acceptable pour *Legionella*.

Il est intéressant d'évaluer à quel niveau de risque correspond ce seuil de gestion de la réglementation française qui s'applique à la qualité de l'eau, mais aussi d'étendre cette évaluation aux aérosols, voies de transmission de la fièvre de Pontiac [Fields *et al.*, 2001].

Nous avons donc choisi d'étudier les facteurs de risque de la fièvre de Pontiac au sein d'une population âgée, exposée à *Legionella* par l'eau et les aérosols de douche, d'une trentaine de maisons de retraite de la région lorraine. L'étude épidémiologique, d'une durée de quatre mois dans chacune des structures de santé, a été réalisée de Juin 2003 à Novembre 2005.

Ce chapitre s'organise en cinq parties : d'une part, l'analyse des antécédents médicaux et des titrages en anticorps permet d'explorer certains facteurs de risque biologiques de la fièvre de Pontiac. Dans un second temps, sont présentées les différentes hypothèses d'exposition des personnes âgées à *Legionella*. Elles permettent, dans un troisième temps, d'évaluer le seuil d'exposition induisant une augmentation du risque de la fièvre de Pontiac, au sein d'une population âgée. Dans un quatrième temps, une analyse de régression logistique multivariée permet de définir et de quantifier les facteurs de risque de la fièvre de Pontiac afin de disposer d'un modèle de prédiction du risque. Enfin, une discussion générale des résultats est présentée.

2 EVALUATION DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC : APPROCHE BIOLOGIQUE

2.1 FACTEURS FAVORISANTS

L'analyse des facteurs de risque de la fièvre de Pontiac s'est attachée d'abord aux caractéristiques intrinsèques des personnes. Cette relation entre l'état de santé, les antécédents médicaux et la survenue de la fièvre de Pontiac a été approfondie à l'aide d'un modèle de régression logistique bivariée afin de connaître les paramètres biologiques qui différenciaient les personnes âgées cas et non cas de fièvre de Pontiac. Ainsi, une relation simple permet de prédire le risque de fièvre de Pontiac à partir de l'état de santé des personnes âgées. Le Tableau 6.1 est un récapitulatif de cette analyse des facteurs de risque de fièvre de Pontiac. Il met en évidence que le genre, la consommation d'alcool ou l'état de santé des personnes âgées n'ont pas d'influence sur le risque de fièvre de Pontiac.

La même analyse a été réalisée en dichotomisant la population (cas et non cas) selon le genre et les mêmes tendances ont été obtenues, à l'exception des antécédents respiratoires. En effet, pour la population totale de l'étude, les antécédents respiratoires n'ont pas d'influence sur la survenue de fièvre de Pontiac (O.R. = 1,50, p=0,42).

Par contre, si on s'attache à la population féminine (donnée non montrée), le fait de présenter un antécédent respiratoire (BPCO, pneumopathie, tuberculose pulmonaire, insuffisance respiratoire, ...) augmente le risque de fièvre de Pontiac d'un facteur de 2,47 (p=0,10).

Par ailleurs, la prise de traitement immunosuppresseur (corticothérapie au cours du suivi) favorise significativement le risque (O.R. = 4,7 ; p=0,03) de développer une fièvre de Pontiac (Tableau 6.1).

Tableau 6. 1 : Risque de développer la fièvre de Pontiac en fonction de l'état de santé (n=828).

Facteurs favorisants	Odds Ratios	I.C. 95%
Sexe (Femme/Homme)	1,12	-
Alcoolisme	0,70	0,09 – 5,30
Diabète	1,09	0,41 – 2,90
Cancer/Hémopathie	0,72	0,17 – 3,10
Antécédents respiratoires	1,50	0,60 – 3,75
Antécédents cardiovasculaires	0,92	0,21 – 3,94
Antécédents cognitifs	**0,44***	0,15 – 1,29
Autres comorbidités	0,72	0,32 – 1,65
Traitement immunosuppresseur	**4,66****	-

Test de χ^2 bilatéral d'homogénéité : *p significatif < 0,15 ; **p significatif < 0,05

Un facteur protecteur de la fièvre de Pontiac a été mis en lumière par la régression logistique (Tableau 6.1) : la présence de troubles cognitifs (démence, débilité, syndrome de Parkinson, ...). Le fait de présenter de tels symptômes protège de 44% la population âgée au risque de fièvre de Pontiac. Afin de valider cette observation, le nombre de prise de douche a été analysé. Les personnes âgées à troubles cognitifs prennent en moyenne le même nombre de douches que les autres personnes âgées sans trouble (Test t de Student : p=0,45). Par conséquent, c'est bien le fait de présenter des troubles cognitifs qui interviendrait, et non un plus faible nombre de douches, ce qui aurait en effet constitué un facteur protecteur à la fièvre de Pontiac. A l'état actuel de l'analyse des données, aucune explication pour ce facteur protecteur ne peut être avancée.

Dans une seconde approche de l'analyse du risque, l'âge des personnes âgées, s'est avéré ne pas être différent statistiquement entre cas et non cas. En effet, comme présenté dans le chapitre précédent, l'âge moyen des personnes âgées, cas ou non, est de 82 ans. Le tabagisme est retrouvé de manière récurrente comme facteur de risque des maladies à atteintes respiratoires, comme la maladie du Légionnaire. Ici, les pratiques tabagiques des personnes âgées, cas-fièvre de Pontiac ou non, ne sont pas différentes statistiquement, que ce soit dans la population totale (hommes et femmes) (p=0,94) ou en dichotomisant cette population selon le genre (Hommes : p=0,88 ; Femmes : p=1,00).

2.2 Analyse des Marqueurs d'Exposition

Au cours de l'étude, des prélèvements biologiques, sang et urine, ont été effectués afin de réaliser une sérologie et une antigénurie anti-*Legionella*.

Ils sont donc considérés comme des marqueurs d'exposition à la bactérie *Legionella*. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'antigénurie pour *L. pneumophila* SG.1 est négative pour toutes les personnes âgées. L'analyse des marqueurs d'exposition a donc été réalisée seulement sur les dosages sérologiques des titres en anticorps dirigés contre 18 espèces de *Legionella* (chapitre 2, §7.2).

Afin d'estimer plus précisément la prévalence des différents titres d'anticorps, chez les personnes âgées, cas-fièvre de Pontiac ou non, seul le titre du sérum le plus élevé atteint chez chaque individu, toutes espèces confondues, est pris en compte : ainsi, une personne ne peut être comptabilisée qu'une fois (Figure 6.1).

La prévalence des anticorps anti-*Legionella* obtenue en tenant compte de tous les titres (du 1/16ème à ≥1/512ème) est identique entre les personnes âgées cas ou non cas fièvre de Pontiac. Toutefois, la prévalence des titres positifs au 1/128ème et positifs au 1/256ème pour les cas-fièvre de Pontiac est plus élevée que dans la population âgée non atteinte, avec 9% d'échantillons sanguins positifs contre respectivement 5% et 3%.

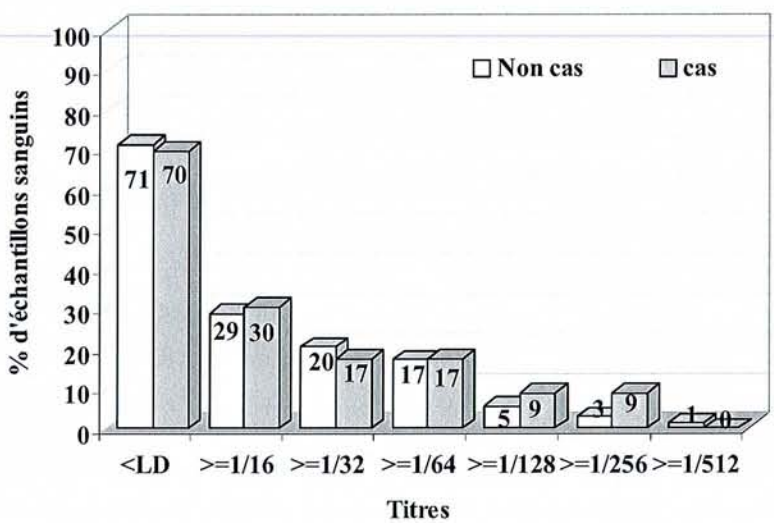


Figure 6. 1 : Prévalence des titres d'anticorps chez les cas de fièvre de Pontiac et dans la population âgée non atteinte (n=671).

Afin d'estimer si ces prévalences de titres en anticorps anti-*Legionella* est un facteur de risque de fièvre de Pontiac, nous avons réalisé un modèle de régression logistique bivariée où les titres en anticorps anti-*Legionella* des 29 personnes âgées-cas fièvre de Pontiac sont comparés à la population non atteinte. Le Tableau 6.2 est un récapitulatif de cette analyse des facteurs de risque de fièvre de Pontiac et met en évidence qu'aucun titre en anticorps n'a d'influence. Toutefois, une attention particulière peut être faite concernant les titres en anticorps positifs au 1/256. En effet, on constate une probabilité accrue d'un facteur 2,95 (p=0,16) de développer une fièvre de Pontiac lorsque le titre d'anticorps est supérieur ou égal à 1/256 (Tableau 6.2).

Certes, l'accroissement du risque n'est pas statistiquement significatif mais la prévalence de ce titre en anticorps se distingue nettement des autres. En outre, les espèces de *Legionella*, correspondant à ces 2 personnes-cas fièvre de Pontiac, sont *L. gormanii* et *L. pneumophila* SG.6.

Tableau 6. 2 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des titres en anticorps (n=828).

Titres des sérums	Cas	Exposés	Odds Ratios	I.C. à 95%	p*
Inférieur à la LD	16	477	0,93	0,38 – 2,30	0,87
Positif au 1/16	7	194	1,08	0,44 – 2,66	0,87
Positif au 1/32	4	136	0,83	0,28 – 2,47	0,49
Positif au 1/64	4	115	1,02	0,34 – 3,05	0,58
Positif au 1/128	2	37	1,63	0,37 – 7,23	0,37
Positif au 1/256	2	21	2,95	0,65 – 13,40	0,16
Positif au 1/512	0	8	1,76**	0,10 – 33,07	0,76

LD : Limite de Détection ; * Test de χ^2 de densité d'incidence unilatéral ; ** calcul effectué en rajoutant ½ à chaque cellule du tableau de contingence.

En conclusion, la séroprévalence des anticorps anti-*Legionella* (titre faible ou élevé), dans une population âgée, n'est pas un bon marqueur de la fièvre de Pontiac, au moins dans un contexte non épidémique.

3 CARACTERISATION DE L'EXPOSITION A *LEGIONELLA*

3.1 PRESENTATION DES DONNEES

Nous avons considéré que l'exposition des personnes âgées à *Legionella* s'effectue durant les prises de douche. Des prélèvements, à la fois d'eau et d'aérosol permettent de caractériser cette exposition (Figure 6.2). Ils ont lieu à la fin des quatre mois de suivi épidémiologique.

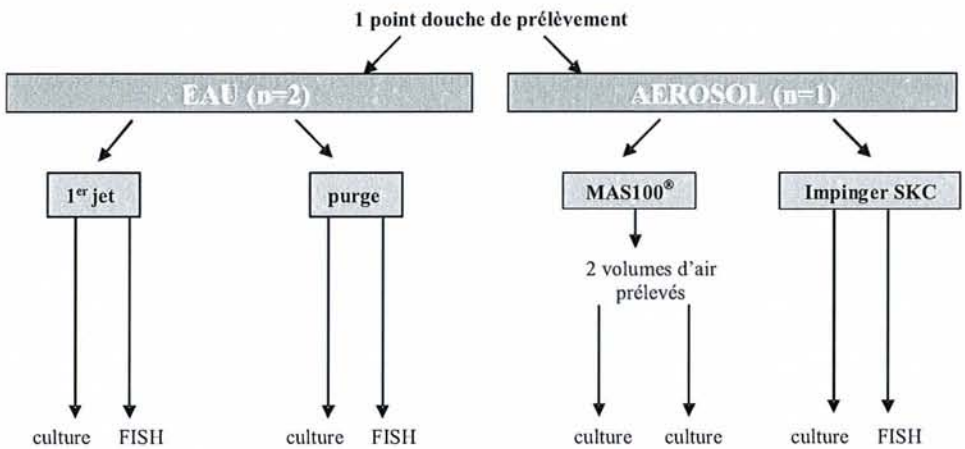


Figure 6. 2 : Présentation des différentes mesures d'exposition à légionelles au niveau des douches – Purge = prélèvement après les 7 minutes de douche ; Impinger SKC = impaction en milieu liquide ; MAS100® = impaction sur milieu solide.

Du fait de la multitude de prélèvements et de techniques d'analyse (culture et FISH), plusieurs hypothèses d'exposition ont été émises et sont présentées ci-après.

3.1.1 Milieu EAU

Deux prélèvements d'eau sont réalisés à chaque point de douche étudié.

Un premier prélèvement d'eau est effectué dès la mise en fonctionnement de la douche, il correspond au « 1er jet ». Ce premier prélèvement, fait sans flambage, à pression et température d'eau chaude maximum, est d'environ 300 mL : il correspond à la vidange du piquage de canalisation qui alimente le robinet.

Après 7 minutes d'écoulement de la douche, un deuxième prélèvement d'eau dit « purge » est réalisé [EPA, 1997]. Ces deux échantillons d'eau sont analysés de manière concomitante par la méthode de culture [AFNOR, 2003] et par la technique d'hybridation *in situ,* comme spécifié dans le chapitre 2 (§6). Toutefois, une personne est exposée principalement à l'aérosol créé par l'eau de purge pendant la durée de sa douche. De ce fait, seules les données d'eau de purge seront analysées dans la suite de ce chapitre. Un duplicat de ces prélèvements d'eau a été réalisé à deux jours d'intervalle au même point de douche et dans les mêmes conditions que spécifié ci-dessus.

3.1.2 Milieu AIR

Un prélèvement d'aérosol a été réalisé à chaque point de douche étudié (chapitre 4, §3.1). Brièvement, deux types de biocollecteurs fonctionnant en parallèle ont été utilisés : le MAS 100® basé sur le principe d'impaction en milieu solide et l'impinger SKC basé sur le principe d'impaction en milieu liquide.

Comme déjà présenté dans les chapitres précédents, sur 164 prélèvements d'air, seulement pour 5 échantillons d'air collectés avec le MAS100®, des *Legionella* cultivables ont été mesurées. Pour les échantillons collectés par impaction liquide, aucune *Legionella* cultivable n'a été détectée mais pour 28,6% des échantillons, *Legionella* a été détectée parla technique d'hybridation *in situ.*

De ce fait, les analyses suivantes ne prennent en compte que les résultats obtenus avec la combinaison [impaction en milieu liquide - technique d'hybridation *in situ*].

3.2 Plan d'Analyse des Donnees

Du fait de l'importante base de données concernant les prélèvements de légionelles, il est nécessaire de définir différentes hypothèses d'exposition, à la fois sur l'EAU et sur l'AIR, afin de s'approcher le plus possible de la réalité d'exposition.

Chaque personne âgée était tenue de prendre une douche hebdomadaire au minimum (critère d'inclusion). Aucune précision n'avait été donnée quant au lieu de prise de douche.

Par conséquent, il s'est avéré que des personnes âgées prenaient des douches dans plusieurs salles de bains au cours des quatre mois de suivi : un maximum de quatre lieux différents ont été recensés. De ce fait, nous avons du tenir compte de cette spécificité d'exposition.

Au total, cinq hypothèses d'exposition ont été formulées : par mesure de simplicité, nous les avons appelées scénario.

3.2.1 Hypothèses d'exposition à *Legionella* présente dans l'eau chaude

Trois scénarios d'exposition ($E_{1\text{-}3}$) à *Legionella* ont été élaborés à partir des mesures réalisées sur l'eau:

1- Le **scénario 1** : l'exposition (E_1) est la valeur maximale de concentration en *Legionella* (C_{eau}) entre tous les points de douche utilisés (d : de 1 à 4 selon les sujets) par les personnes âgées, duplicat compris.

$$E_1 = \max(C_{eau\,di}) \text{ pour } d=1,\ldots 4 \text{ et } i=1 \text{ ou } 2 \tag{6.1}$$

E_1 représente donc l'exposition extrême à *Legionella* pour les personnes âgées.

2- Le **scénario 2** : l'exposition (E_2) est la valeur maximale de concentration en *Legionella* (C_{eau}) entre tous les points de douche utilisés (d : de 1 à 4 selon les sujets) par les personnes âgées, calculée sur la valeur moyenne des résultats du duplicat à chaque point de douche.

$$E_2 = \max\left(\frac{C_{eau_{d1}} + C_{eau_{d2}}}{2}\right) \text{ pour } d=1,\ldots 4 \tag{6.2}$$

E_2 reflète l'exposition moyenne extrême à *Legionella* pour les personnes âgées.

3- Le **scénario 3** : l'exposition (E_3) est le produit des teneurs de *Legionella* (C_{eau}) pour chaque point de douche utilisé (d : de 1 à 4 selon les sujets) et de leur fréquence d'utilisation (N) durant les quatre mois de suivi épidémiologique.

$$E_3 = \frac{\sum_{d=1}^{4} C_{eau\,d} \times N_d}{\sum_{d=1}^{4} N_d} \tag{6.3}$$

E_3 représente l'exposition à *Legionella* pondérée par la fréquence d'utilisation de chaque point de douche. Il s'agit donc de l'hypothèse d'exposition la plus proche de la réalité pour les personnes âgées.

3.2.2 Hypothèses d'exposition à *Legionella* présente dans les aérosols de douche

Deux autres scénarios d'exposition à *Legionella* ont été élaborés à partir des mesures réalisées sur l'aérosol de douche ; rappelons qu'il n'y a pas, ici, de mesure répétée :

4- Le **scénario 4** : l'exposition (E_4) est la valeur maximale de concentration en *Legionella* (C_{air}) entre tous les points de douche utilisés (d : de 1 à 4 selon les sujets) par les personnes âgées.

$$E_4 = \max(C_{air\,d}) \text{ pour } d=1,\ldots 4 \tag{6.4}$$

E_4 représente donc l'exposition extrême à *Legionella* aéroportée pour les personnes âgées.

5- Le **scénario 5** : l'exposition (E_5) est le produit des teneurs de *Legionella* (C_{air}) pour chaque point de douche utilisé (d : de 1 à 4 selon les sujets) et de leur fréquence d'utilisation (N) durant les quatre mois de suivi épidémiologique.

$$E_5 = \frac{\sum_{d=1}^{4} C_{air\,d} \times N_d}{\sum_{d=1}^{4} N_d} \tag{6.5}$$

E_5 représente l'exposition à *Legionella* aéroportée pondérée par la fréquence d'utilisation de chaque point de douche.

4 EVALUATION DU RISQUE DE FIEVRE DE PONTIAC : APPROCHE ENVIRONNEMENTALE

4.1 Exposition Basee sur les Teneurs de *Legionella* dans l'Eau

4.1.1 Evaluation du risque de fièvre de Pontiac en fonction des concentrations en *Legionella* cultivables

L'analyse des facteurs de risque de la fièvre de Pontiac s'est attachée d'abord aux teneurs en *Legionella* cultivables dans l'eau chaude. Cette relation entre la teneur en *Legionella* cultivables et la survenue de la fièvre de Pontiac a été approfondie à l'aide de régressions logistiques où l'exposition à *Legionella* cultivables des 29 personnes âgées-cas fièvre de Pontiac est comparée à celle du reste de la population générale exposée.

Trois valeurs seuils d'exposition en *Legionella* cultivables (UFC.L^{-1}) dans l'eau chaude des douches ont été choisies : 10^3, 10^4 et 10^5 UFC.L^{-1} eau.

Le tableau 6.3 est un récapitulatif de l'analyse de l'exposition à *Legionella* cultivable comme facteur de risque de fièvre de Pontiac. Quelle que soit l'hypothèse d'exposition à *Legionella* dans l'eau décrite ci-dessus (§3.2.1), 18/29 des personnes-cas fièvre de Pontiac (62,1%) ne sont pas exposées à la bactérie cultivable (concentration en *Legionella* cultivable inférieure à la limite de détection de la méthode). L'analyse des risques, pour chaque hypothèse d'exposition, est donc réalisée sur cinq personnes malades exposées.

Tableau 6. 3 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des hypothèses d'exposition et de la concentration de Legionella cultivables dans l'eau chaude.

Hypothèses d'exposition	Concentration (*Legionella* .L^{-1} eau)	Odds Ratios	I.C. à 95%	p*
Scénario 1 *Concentration maximum : E_1*	Inférieure à LD	1,00	-	-
	$\geq 10^3$	1,04	0,4 - 2,73	0,54
	$\geq 10^4$	**2,57**	0,89 - 7,38	0,09
	$\geq 10^5$	1,67	0,23 - 12,25	0,46
Scénario 2 *Maximum des concentrations moyennes : E_2*	Inférieure à LD	1,00	-	-
	$\geq 10^3$	1,35	0,52 - 3,55	0,34
	$\geq 10^4$	1,15	0,16 - 8,45	0,59
	$\geq 10^5$	2,55	0,35 -18,78	0,33
Scénario 3 *Pondération des concentrations : E_3*	Inférieure à LD	1,00	-	-
	$\geq 10^3$	1,52	0,58 - 3,99	0,27
	$\geq 10^4$	1,32	0,18 - 9,69	0,54
	$\geq 10^5$	2,81	0,38 - 20,66	0,31

LD = Limite de Détection, 10^2 UFC-*Legionella*.L^{-1} eau ; *Test du χ^2 de densité d'incidence unilatéral.

Ainsi, pour les scénarios nommés 2 et 3 et à partir de la concentration 10^4 UFC.L^{-1}, le risque de survenue de la fièvre de Pontiac est croissant avec l'augmentation des concentrations en *Legionella* cultivables de l'eau chaude. Mais, cette augmentation du risque n'est pas statistiquement significative.

Toutefois, une personne âgée exposée (concentration en *Legionella* cultivables) à une concentration minimum de 10^4 *Legionella*-UFC.L^{-1} d'eau pendant ses prises de douche présente un risque de survenue de la fièvre de Pontiac significatif (O.R. 2,6 ; p=0,1) que si son exposition est inférieure à cette concentration.

4.1.2 Evaluation du risque de fièvre de Pontiac en fonction des concentrations en *Legionella* hybridées (FISH)

Les mêmes modèles de régression logistique ont été utilisés afin d'approfondir la relation entre la teneur en *Legionella*-FISH dans l'eau et la survenue de la fièvre de Pontiac. Quelle que soit l'hypothèse d'exposition à *Legionella* présente dans les eaux chaudes, un minimum de 72,4% (21/29)* des personnes-cas fièvre de Pontiac sont exposées à la bactérie mesurée par la technique d'hybridation

* Une personne atteinte de fièvre de Pontiac est exposée à une concentration en *Legionella*-FISH comprise entre 10^3 et 10^4 *Legionella*.L^{-1} eau.

in situ (Tableau 6.4). L'analyse des risques, pour chaque hypothèse d'exposition, est donc réalisée dans ce cas à partir des données de 20 personnes malades exposées.

Trois valeurs seuils d'exposition en *Legionella* hybridées (FISH) dans l'eau chaude des douches ont été choisies : 10^4, 10^5 et 10^6 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau.

Tableau 6. 4 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des hypothèses d'exposition et de la concentration de Legionella mesurée par la technique FISH dans l'eau chaude.

Hypothèses d'exposition	Concentration (*Legionella* .L^{-1} eau)	Odds Ratios	I.C. à 95%	p*
Scénario 1 *Concentration maximum : E_1*	Inférieure à LD	1,00	-	-
	$\geq 10^4$	1,11	0,51 - 2,44	0,48
	$\geq 10^5$	**2,02**	0,97 - 4,19	0,05
	$\geq 10^6$	**2,52**	0,96 - 6,59	0,07
Scénario 2 *Maximum des concentrations moyennes : E_2*	Inférieure à LD	1,00	-	-
	$\geq 10^4$	1,11	0,51 - 2,44	0,48
	$\geq 10^5$	**2,53**	1,22 - 5,26	0,01
	$\geq 10^6$	**2,77**	1,06 - 7,26	0,05
Scénario 3 *Pondération des concentrations : E_3*	Inférieure à LD	1,00	-	-
	$\geq 10^4$	1,43	0,65 - 3,13	0,25
	$\geq 10^5$	**2,32**	1,11 - 4,85	0,02
	$\geq 10^6$	**3,78**	1,44 - 9,92	0,02

LD = Limite de Détection, 9.10^3 *Legionella*-hybridées.L^{-1} eau ; *Test du χ^2 de densité d'incidence unilatéral.

Le risque de survenue de la fièvre de Pontiac est croissant avec l'augmentation des concentrations en *Legionella*-FISH de l'eau pour toutes les hypothèses d'exposition élaborées. Ainsi, si une personne âgée est exposée pendant ses prises de douche, au minimum à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau, elle a entre 2 (p=0,05) et 2,5 fois (p=0,01) plus de risque de développer la fièvre de Pontiac que si l'exposition est inférieure à cette concentration.

Considérant la fréquence d'exposition, avec le nombre de prises de douche différencié suivant les lieux (scénario 3), le risque de survenue de la fièvre de Pontiac est multiplié par 2,3 (p=0,02) si la personne âgée est exposée à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau en moyenne et par 3,8 (p=0,02) si elle est exposée à 10^6 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau, en comparaison avec des concentrations inférieures à ces concentrations.

4.2 Etablissement d'une Relation Dose-Effet sur l'Eau Chaude

Le paragraphe précédent (4.1) montre que le risque de développer la fièvre de Pontiac est croissant avec les concentrations en *Legionella* détectée dans l'eau chaude, avec les deux technique de détection utilisées (culture accessoirement, et surtout par hybridation *in situ*). Il est maintenant intéressant de caractériser la loi que suit la relation dose-effet. Des modèles de régression logistique ont donc été utilisés afin d'établir et de quantifier cette relation.

4.2.1 Dose = *Legionella* cultivables

Nous avons pris en compte les mesures de *Legionella* correspondant à l'hypothèse d'exposition la plus proche de la réalité, c'est-à-dire l'exposition (E_3) tenant compte à la fois des différents points de douche utilisés et de leur fréquence d'utilisation (équation 6.3).

Trois classes de concentrations en *Legionella* cultivables dans l'eau chaude de douches ont été établies :

- de 10^3 à 10^4 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau ;
- de 10^4 à 10^5 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau et
- au-delà de 10^5 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau.

Chaque classe de concentration est comparée à la classe de référence, ici 10^3 *Legionella*.L^{-1} eau (Tableau 6.5).

Tableau 6. 5 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des classes de concentration en Legionella cultivables dans l'eau chaude de douche.

Concentration (*Legionella*.L^{-1} eau)	**Cas exposés**	**Odds Ratios**	**I.C. à 95%**	**p**
$[10^3 - 10^4[$	4	1,64	0,6 - 4,9	0,37
$[10^4 - 10^5[$	0	ND	ND	0,98
$\geq 10^5$	1	ND	ND	0,98

ND = Non déterminé par la faiblesse de l'effectif des cas exposés.

Ces trois classes de contamination en *Legionella* cultivables ont été reliées à la probabilité de survenue de la fièvre de Pontiac (P_{UFC}) en considérant la concentration comme une variable quantitative, et nous avons établi la relation dose-effet suivante (équation 6.6) :

$$Logit(P_{UFC}) = -3{,}36 + 0{,}26x \quad (p=0{,}39) \qquad (6.6)$$

Quelles que soient les concentrations de *Legionella* cultivables dans l'eau chaude, le risque de fièvre de Pontiac est indépendant de ces niveaux. Il ne semble pas y avoir de relation linéaire (sur l'échelle Log) entre la concentration en *Legionella* cultivables et la fièvre de Pontiac ; cependant les effectifs sont faibles voire nuls pour certaines classes de concentrations.

4.2.2 Dose = *Legionella* détectées avec la technique FISH

La même analyse a été réalisée avec cette fois les mesures en *Legionella* détectée par hybridation *in situ*. Nous avons pris en compte les mesures de *Legionella* correspondant à l'hypothèse d'exposition la plus proche de la réalité, c'est-à-dire l'exposition (E_3) tenant compte à la fois des différents points de douche utilisés et de leur fréquence d'utilisation (équation 6.3).

Trois classes de concentrations de *Legionella* détectées par hybridation *in situ* (FISH) dans l'eau chaude ont été établies :

- de 10^4 à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau ;
- de 10^5 à 10^6 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau et
- au-delà de 10^6 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau.

Chaque classe est comparée à la classe de référence : $< 10^4$ *Legionella*-FISH.L^{-1} eau.

Ainsi, le risque de survenue de la fièvre de Pontiac est croissant avec l'augmentation des concentrations en *Legionella*-FISH de l'eau chaude (Tableau 6.6), mais cette augmentation de risque n'est que significative à $p \geq 0,11$.

Tableau 6. 6 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des classes de concentration en Legionella détectée par la technique FISH dans l'eau chaude des douches.

Concentration (*Legionella*.L^{-1} eau)	**Cas exposés**	**Odds Ratios**	**I.C. à 95%**	**p**
$[10^4 - 10^5[$	8	0,94	0,4 - 2,5	0,90
$[10^5 - 10^6[$	7	1,81	0,6 - 5,1	0,26
$\geq 10^6$	5	2,66	0,8 - 8,9	0,11

Ces trois classes de contamination en *Legionella*-FISH des eaux chaudes ont été reliées à la probabilité de survenue de la fièvre de Pontiac (P_{FISH}), en considérant la concentration comme une variable quantitative, et nous avons établi la relation dose-effet suivante (équation 6.7) :

$$Logit(P_{FISH}) = -3,73 + 0,46x \quad (p=0,02) \qquad (6.7)$$

L'équation 6.7 exprime la relation de type linéaire (sur l'échelle Log) entre la concentration en *Legionella* hybridée dans l'eau chaude (FISH), et la fièvre de Pontiac. Plus l'exposition à *Legionella* (FISH) est grande en terme de concentration, plus le risque de survenue de fièvre de Pontiac augmente.

4.3 Exposition aux Aerosols de *Legionella*

Dans une seconde approche, l'analyse des facteurs de risque de la fièvre de Pontiac s'est attachée aux teneurs en *Legionella* aéroportées.

4.3.1 Evaluation du risque de fièvre de Pontiac chez les cas

La relation entre la teneur en *Legionella* aéroportée et la survenue de la fièvre de Pontiac a été approfondie à l'aide de régressions logistiques bivariées où l'exposition à *Legionella* cultivables des 29 personnes âgées-cas fièvre de Pontiac est comparée à celle du reste de la population d'étude.

Le Tableau 6.7 est un récapitulatif de cette analyse de l'exposition comme facteur de risque de la fièvre de Pontiac. Quelle que soit l'hypothèse d'exposition à *Legionella* dans l'aérosol élaborée ci-dessus, un minimum 62,1% (18/29) des personnes-cas fièvre de Pontiac est exposé à des aérosols dans lesquels des légionelles n'ont pas été détectées par les méthodes utilisées. L'analyse des risques est donc réalisée sur les 10 personnes exposées à des aérosols de légionelles détectées par hybridation *in situ* pour les deux scénarios d'exposition (Tableau 6.7).

Quelle que soit l'hypothèse d'exposition, si une personne âgée est exposée au minimum à 10^3 *Legionella*-FISH.L^{-1} air pendant ses prises de douche, elle a de 64% (E_4 : O.R. = 1,64) à 86% (E_5 : O.R. = 1,86) de plus de risque de développer la fièvre de Pontiac que si l'exposition est inférieure à cette concentration. Pour le scénario nommé 4, le risque de survenue de la fièvre de Pontiac est croissant avec l'augmentation des concentrations en *Legionella* aéroportée.

Tableau 6. 7 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction de la concentration de Legionella mesurée par la technique FISH sur les échantillons d'air collectés par impaction liquide.

Hypothèses d'exposition	Concentration (*Legionella*.L^{-1} air)	Odds Ratios	I.C. à 95%	p*
Scénario 4 *Concentration maximum : E_4*	Inférieure à LD	1,0	-	-
	$\geq 10^3$	**1,64**	0,76 -3,52	0,15
	$\geq 10^4$	**2,08**	0,85 -5,11	0,10
Scénario 5 *Pondération des concentrations : E_5*	Inférieure à LD	1,0	-	-
	$\geq 10^3$	**1,86**	0,86 -3,99	0,09
	$\geq 10^4$	0,87	0,21 -3,67	0,6

LD = Limite de Détection, 3.10^2 *Legionella*-hybridées.L^{-1} air ; *Test du χ^2 de densité d'incidence, p unilatéral

4.3.2 Evaluation du risque de fièvre de Pontiac chez les cas exposés uniquement à *Legionella* aéroportée

Afin d'améliorer l'évaluation du risque et se rapprocher au plus près de la réalité d'exposition à *Legionella*, nous n'avons, dans une seconde phase d'analyse, restreint la définition d'un cas de fièvre de Pontiac. En effet, nous n'avons considéré que les personnes répondant à la définition de la fièvre de Pontiac et uniquement exposées à *Legionella* aéroportée, soit 11 personnes.

Les mêmes modèles mathématiques de régression logistique bivariée ont été utilisés afin d'approfondir la relation entre la teneur en *Legionella*-FISH dans l'air et la survenue de la fièvre de Pontiac (Tableau 6.8).

Par rapport à la première phase d'analyse des risques d'exposition à *Legionella* aéroportée, le tableau 6.8 met en évidence un risque accru de survenue de la fièvre de Pontiac.

Quel que soit le scénario d'exposition, une personne âgée exposée au minimum à 10^3 *Legionella*-FISH.L^{-1} air à de 31,1 (E_4) à 35,2 (E_5) fois plus de risque de présenter la fièvre de Pontiac que pour des concentrations inférieures. Cependant, le risque de fièvre de Pontiac n'augmente pas régulièrement avec l'augmentation des teneurs en *Legionella* aéroportée.

Tableau 6. 8 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction de la concentration de Legionella mesurée par la technique FISH sur les échantillons d'air collectés par impaction liquide.

Hypothèses d'exposition	Concentration (*Legionella*.L^{-1} air)	Odds Ratios	I.C. à 95%	p*
Scénario 4 *Concentration maximum : E_4*	Inférieure à LD	1,0	-	-
	$\geq 10^3$	**31,10**	3,98 – 242,96	$<10^{-4}$
	$\geq 10^4$	**9,58**	2,2 – 31,38	$<10^{-3}$
Scénario 5 *Pondération des concentrations : E_5*	Inférieure à LD	1,0	-	-
	$\geq 10^3$	**35,25**	4,51 – 275,37	$<10^{-4}$
	$\geq 10^4$	2,62	0,57 – 12,12	0,21

LD = Limite de Détection ; *Test du χ^2 de densité d'incidence, p unilatéral

5 DETERMINATION DES FACTEURS DE RISQUE DE LA FIEVRE DE PONTIAC

5.1 RAPPEL DES DONNEES

Afin d'évaluer le risque de fièvre de Pontiac pour les personnes âgées, l'état de santé des personnes âgées a d'abord été considéré. Deux paramètres sont liés au risque de contracter la maladie : la prise d'un traitement immunosuppresseur et la présence de troubles cognitifs (§2.1). Puis a été considérée l'exposition à *Legionella* : d'abord dans l'eau chaude puis dans l'aérosol. Une relation dose-effet a été établie entre les teneurs de *Legionella*, mesurées par FISH dans l'eau chaude et la maladie. De plus, un risque de 2,32 (E_3) a été établi entre l'exposition au minimum à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau et la maladie.

Il s'agit dans cette partie de construire un modèle explicatif/prédictif de la fièvre de Pontiac qui intègre ces différents variables. Nous avons pour cela utilisé un modèle de régression logistique multivariée.

5.2 FACTEURS DE RISQUE DE LA FIEVRE DE PONTIAC

La régression logistique multivariée a été ajustée sur l'âge et le genre des sujets, bien que ces caractères ne se soient pas révélés être des facteurs de risque dans l'analyse précédente.

Le Tableau 6.9 met en évidence deux facteurs de risque de développer une fièvre de Pontiac : la concentration minimum de 10^5 *Legionella* FISH.L^{-1} eau (O.R.= 2,3 et p=0,03) et la prise d'un traitement immunosuppresseur (O.R.= 4,0 et p=0,04).

Il est à noter que les troubles cognitifs, en régression multivariée, ne sont pas liés statistiquement à la survenue de fièvre de Pontiac.

Tableau 6. 9 : Risque de fièvre de Pontiac en fonction des facteurs favorisants

Facteurs de risque	Odds Ratios	I.C. à 95%	p
Age (classe ≥ 75 ans)	1,2	0,45 - 3,3	0,69
Age (classe ≥ 90 ans)	1,4	0,42 - 4,3	0,61
Sexe (Homme)	1,0	0,42 - 2,4	0,99
≥ 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau	**2,3**	**1,1 - 5,1**	0,03
Traitement immunosuppresseur[1]	**4,0**	**1,1 - 14,9**	0,04
Antécédents cognitifs[2]	0,5	0,2 - 1,3	0,15

[1] Corticothérapie ; [2] Antécédents cognitifs : démence, débilité et syndrome de parkinson

6 DISCUSSION

Les éléments développés dans ce chapitre ont permis de déterminer les facteurs favorisant de la fièvre de Pontiac : (i) relatifs à l'état de santé et aux antécédents des personnes âgées ; (ii) reliés à l'exposition en *Legionella* mesurées dans l'eau et l'aérosol. Ils ont permis (iii) de disposer d'un modèle de prédiction du risque de fièvre de Pontiac chez la personne âgée.

6.1 FACTEURS DE RISQUE BIOLOGIQUES DE LA FIEVRE DE PONTIAC

6.1.1 Antécédents médicaux

L'analyse des antécédents de santé et des caractéristiques des cas fièvre de Pontiac a montré que seules la présence de troubles cognitifs et la prise de corticothérapie sont des facteurs associés à la fièvre de Pontiac.

Du fait de l'âge « jeune » des cas de fièvre de Pontiac dans la littérature, aucune donnée ne renseigne sur la relation entre troubles cognitifs (démence, syndrome de Parkinson, ...) et la fièvre de Pontiac. A l'heure actuelle, nous ne disposons donc pas d'éléments permettant d'expliquer cette relation, c'est pourquoi, il serait intéressant de l'explorer ultérieurement par d'autres études.

Notre étude a aussi permis de mettre en évidence une relation forte entre la prise de corticothérapie et la fièvre de Pontiac (O.R. = 4,0 ; I.C. à 95% : 1,1 - 14,9) puisqu'elle a été corroborée avec la régression logistique multivariée. Certes, la corticothérapie n'a jamais été définie comme facteur de risque de fièvre de Pontiac mais elle a déjà été recensée dans la littérature chez des cas de fièvre de Pontiac [Götz *et al.*, 2001 ; Fenstersheib *et al.*, 1990].

Aucun autre antécédent de santé chez les personnes âgées ne s'est avéré être un facteur favorisant à la fièvre de Pontiac. La seule étude qui s'est attachée aux antécédents médicaux des cas de fièvre de Pontiac corrobore notre analyse en spécifiant aucune différence statistique significative entre les cas et les personnes exposées saines [Benin *et al.*, 2002]. Toutefois, il faut préciser que les travaux de Benin [Benin *et al.*, 2002] ne mentionnent pas si les troubles cognitifs et immunosuppresseurs faisaient partie des antécédents médicaux recherchés.

6.1.2 Age, genre et pratiques tabagiques

Notre étude, se déroulant dans un contexte non épidémique, montre que ni l'âge, ni le genre et ni le tabagisme sont des facteurs favorisants à la fièvre de Pontiac.

D'autres travaux corroborent notre résultat d'analyse en concluant aussi que l'âge n'est pas un facteur à risque à la fièvre de Pontiac [Friedman *et al.*, 1987 ; Mangione *et al.*, 1985]. En effet, l'âge ne semble pas être un facteur favorisant à la fièvre de Pontiac dans la mesure où les épidémies de fièvre de Pontiac font état de malades âgés de 12 ans [Benin *et al.*, 2002] à 46 ans [Fenstersheib *et al.*, 1990].

D'autre part, le genre masculin ne constitue pas un facteur favorisant de la fièvre de Pontiac (O.R.=1,2 ; I.C. à 95% : 0,45 - 3,3). Ce résultat n'est pas isolé puisque les quelques études disponibles sur ce sujet tendent à montrer que le genre n'a aucune influence sur le survenue de la fièvre de Pontiac [Götz *et al.*, 2001 ; Fenstersheib *et al.*, 1990 ; Friedman *et al.*, 1987].

Enfin, chez les personnes âgées lorraines, il n'y a aucune différence statistique significative entre les pratiques tabagiques et la survenue de la fièvre de Pontiac. Les études, sont en contradictoires sur ce facteur de risque : pour certains, les pratiques tabagiques n'ont aucune influence sur la fièvre de Pontiac [Benin *et al.*, 2002 ; Friedman *et al.*, 1987 ; Mangione *et al.*, 1982] et pour d'autres elles constituent un risque d'un facteur 1,16 (I.C. à 95% : 0,8 - 3,2) [Götz *et al.*, 2001] à un facteur 5,1 (I.C. à 95% : 1,1 - 14,9) [Huhn *et al.*, 2005]. Toutefois, dans ces deux études où les pratiques tabagiques sont un facteur de risque, les cas sont plus âgées que toutes les autres études sur la fièvre de Pontiac : 57 ans [Götz *et al.*, 2001] et 58 ans [Huhn *et al.*, 2005]. Dans ces études, c'est donc l'action de l'âge et du tabagisme qui constitue un facteur de risque. Au contraire de la maladie du Légionnaire, l'autre pathologie due à *Legionella*, il est à noter que le tabagisme, dans le cadre de notre étude ne constitue pas un facteur favorisant à la fièvre de Pontiac.

6.2 SEROPREVALENCE DES ANTICORPS CHEZ LES CAS-FIEVRE DE PONTIAC

La prévalence des titres en anticorps des dosages sanguins des personnes-cas fièvre de Pontiac n'est pas statistiquement différente de celle de la population âgée non atteinte. Le fait que notre étude soit réalisée dans un contexte non épidémique peut expliquer ce résultat contradictoire avec les épidémies publiées de fièvre de Pontiac où les cas présentent des titres en anticorps statistiquement supérieurs aux titres des personnes saines exposées [Benin *et al.*, 2002 ; Friedman *et al.*, 1987 ; Miller *et al.*, 1983 ; Herwaldt *et al.*, 1980] avec même un risque quantifié à 4,81 (I.C. à 95% : 0,66 – 113,89) [Friedman *et al.*, 1987]. Toutefois, lors les travaux de recherche réalisés pendant des épidémies de fièvre de Pontiac, les mesures des anticorps anti-*Legionella* ne sont pas réalisées de manière systématique sur les cas et les personnes non atteintes. A notre connaissance, seules quelques études en font état [Benin *et al.*, 2002 ; Friedman *et al.*, 1987 ; Herwaldt *et al.*, 1984 ; Miller *et al.*, 1983], en usant des dosages en anticorps comme marqueurs d'infection des populations exposées (cas et non cas) et non comme marqueur d'exposition, comme dans le cadre de notre étude.

De plus, dans notre étude, la durée d'exposition à *Legionella*, appréciée par le nombre de prises de douches, n'est pas reliée à la prévalence des titres en anticorps. A notre connaissance, aucune étude n'a étudié la relation entre séroprévalence et prise de douches, dans un contexte épidémique ou non. Toutefois, deux études proposent des relations dose-effet entre la durée d'exposition à *Legionella* (piscine et fontaine décorative) et la prévalence des titres en anticorps anti-*Legionella* pendant un contexte épidémique chez les cas fièvre de Pontiac [Benin *et al.*, 2002 ; Fenstersheib *et al.*, 1990].

A l'heure actuelle, il n'existe pas de données faisant état de la séroprévalence des anticorps anti-*Legionella* des personnes âgées pendant une épidémie de fièvre de Pontiac. Notre étude a montré que la fréquence des titres élevés en anticorps (positifs à 1/128) est de 9% pour les personnes âgées-cas de fièvre de Pontiac. Cette proportion se situe dans la large gamme de prévalence, de titres élevés en anticorps anti-*Legionella* dans les populations atteintes, retrouvée dans la littérature au cours d'épidémies de fièvre de Pontiac, variant de 2,1% à 84,6% [Castor *et al.*, 2005 ; Huhn *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003 ; Fields *et al.*, 2001 ; Gregersen *et al.*, 1999 ; Lüttichau *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 1993 ; Friedman *et al.*, 1987].

Enfin, nous avons montré que pour les cas fièvre de Pontiac, les espèces de *Legionella*, contre lesquelles les anticorps anti-*Legionella* sont dirigés sont *L. gormanii* et *L. pneumophila* SG.6. Au contraire de la maladie du légionnaire, *L. pneumophila* n'est donc pas la plus souvent retrouvée dans la fièvre de Pontiac [Huhn *et al.*, 2005 ; Lüttichau *et al.*, 1998]. Les espèces *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. dumoffii* ou encore *L. feelei* ont été considérées comme à l'origine de cas de fièvre de Pontiac [Huhn *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003 ; Fields *et al.*, 2001 ; Fenstersheib *et al.*, 1990 ; Herwaldt *et al.*, 1984].

6.3 Lien entre Exposition a *Legionella* et Fievre de Pontiac

Un des critères de la définition d'un cas de fièvre de Pontiac est la mesure de l'exposition à l'agent infectant : *Legionella*. Ce travail représente la première étude portant sur l'exposition de personnes à *Legionella* lors de prise de douche, dans un cadre non épidémique. Les cas de fièvre de Pontiac ont été systématiquement décrit dans un contexte épidémique, donc associés à des contaminations aiguës d'installations à risques, telles que des jacuzzis, fontaines décoratives [Benin *et al.*, 2002 ; Fields *et al.*, 2001 ; Fenstersheib *et al.*, 2001 ; Götz *et al* ., 2001 ; Spitalny *et al.*, 1984 ; Mangione *et al.*, 1985] ou des tours aéroréfrigérantes [Mangione *et al.*, 1985].

Dans ce travail, plusieurs scénarios ont été élaborés afin de s'approcher au mieux à la réalité de l'exposition des personnes âgées, et leurs résultats tendent à la même conclusion. En effet, l'exposition définie sur les mesures de *Legionella* cultivables dans l'eau ne semble pas être reliée à la survenue de fièvre de Pontiac à l'exception d'un seuil d'exposition à 10^4 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau (O.R. = 2,57 ; I.C. 95% : 0,89 - 7,38). Toutefois, la littérature sur les épidémies de fièvre de Pontiac ne fournit pas plus d'informations. En effet, les épidémies où la bactérie a été mesurée ont défini des concentrations de *Legionella* cultivables de $9{,}0.10^{-2}$ *Legionella*-UFC.L^{-1} à $3{,}00.10^{2}$ *Legionella*-UFC.L^{-1} eau [Castor *et al.*, 2005 ; Fields *et al.*, 2001 ; Friedman *et al.*, 1987].

Une attention particulière peut être portée au seuil de 10^3 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau fixé par la réglementation française [DGS, 2002]. Notre étude n'a pas permis d'identifier un risque de fièvre de Pontiac à ce seuil, mais l'a retrouvé au-delà, pour 10^4 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau. De plus, il faut bien entendu tenir compte que notre seuil à 10^4 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau a été obtenu au regard de la

population âgée étudiée, une population sensible : ce seuil représente donc certainement un excès de risque. De ce fait, le seuil fixé par la réglementation française, 10^3 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau, est, dans le cadre de notre étude, protecteur pour la population générale face au risque épidémique de fièvre de Pontiac, au regard de nos résultats. De plus, aucun cas de maladie du Légionnaire, qui n'était d'ailleurs pas l'objet de l'étude, n'a été identifié quelles que soient les concentrations en *Legionella* dans l'eau ; le seuil de 10^3 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau constitue donc une certaine marge de sécurité à l'éventualité d'une maladie du Légionnaire.

Ces seuils sont établis sur la base de la capacité à cultiver des légionelles. Cependant, même si la culture est la méthode de référence dans le cadre législatif, il est admis qu'elle sous-estime la population réelle de *Legionella* [Nyström, 2001, Hussong *et al.*, 1987], c'est pourquoi nous avons utilisé de manière concomitante à la culture, une nouvelle technique de détection de *Legionella*, l'hybridation *in situ*. Nous avons montré que les concentrations en *Legionella*-FISH dans l'eau chaude sont liées à la survenue de la fièvre de Pontiac, selon une relation dose-réponse. Une personne âgée exposée au minimum à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1} eau, présente un risque accru d'un facteur 2,3 (I.C. à 95% : 1,1 - 5,1) de développer la fièvre de Pontiac. Cette relation dose-réponse constitue une base solide de prévention du risque de fièvre de Pontiac, surtout chez les populations sensibles. Elle a l'avantage, au contraire de la réglementation française, d'être basée sur des résultats d'observation épidémiologique.

A notre connaissance, cette analyse est la première reliant la survenue de la fièvre de Pontiac à une mesure de *Legionella* aéroportée. Ainsi, une personne âgée exposée à une teneur minimale de 10^4 *Legionella*-FISH.L^{-1} air présente un risque accru d'un facteur 1,86 (I.C. à 95% : 0,86 – 3,99) de développer la fièvre de Pontiac. En ne considérant que les personnes-cas exposées à des aérosols contaminés par au minimum 10^3 *Legionella*-FISH.L^{-1} air, il s'est avéré que le risque de développer la fièvre de Pontiac était supérieur à 30 (E_4, O.R. = 31,1 ; E_5, O.R. = 35,25). Ce risque élevé, obtenu pour des concentrations dans l'aérosol, est encore plus élevé que celui obtenu pour des concentrations dans l'eau chaude avec la même technique, FISH, et ce malgré le faible effectif de cas, onze. Il semblerait donc que ce soit la voie d'exposition -aérosol- , qui pèse le plus sur le risque de fièvre de Pontiac, au regard de nos résultats, et qui soit donc à privilégier dans des travaux ultérieurs sur le risque de fièvre de Pontiac ou tout autre infection liée à *Legionella*.

En conclusion, l'identification des personnes cas fièvre de Pontiac, parmi cette population âgée, nous a permis de définir et de déterminer les facteurs de risque à la fois biologiques et environnementaux de survenue de fièvre de Pontiac. Deux paramètres ont donc été identifiés et quantifiés :

- la prise de corticoïdes : O.R. = 4,0 (I.C. à 95% : 1,1 - 14,9) ;
- et l'exposition à $\geq 10^5$ *Legionella*-FISH.L^{-1} eau : O.R. = 2,3 (I.C. à 95% : 1,1 - 5,1).

Par ailleurs, il est intéressant de souligner que l'exposition d'une personne âgée à un aérosol contaminé au minimum par 10^3 *Legionella*-FISH.L^{-1} air, pendant ses prises de douche, augmente le risque au moins de 64% qu'elle développe la fièvre de Pontiac.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Trois décennies après sa découverte, *Legionella* constitue toujours un problème de santé publique. Les épidémies de maladie du Légionnaire sont en croissante évolution et la fièvre de Pontiac, autre forme clinique due à la bactérie pathogène est encore mal connue et, de ce fait, sûrement sous-estimée. Par ailleurs, la caractérisation de ce risque bactérien demeure limitée, en particulier par des aspects métrologiques - mesure et détection de *Legionella* dans les aérosols.

Dans ce contexte, les objectifs des travaux présentés dans ce mémoire étaient :

(i) de déterminer l'occurrence de *Legionella* dans les eaux chaudes issues de douche dans une trentaine de maisons de retraite de la région Lorraine, et de la relier à une analyse des points critiques de chaque réseau d'eau des établissements, afin de disposer d'un modèle prédictif de contamination des eaux chaudes sanitaires aux points d'usage à partir des données d'un diagnostic réseau.

(ii) de tester les moyens de collecte de bioaérosols et de détection de légionelles aéroportées, afin d'apprécier la contamination des aérosols d'eau chaude de douche par *Legionella*, dans ces mêmes établissements, et de la mettre en relation avec la contamination en *Legionella* des eaux.

(iii) de réaliser une étude épidémiologique, portant sur les infections à *Legionella* lors d'une exposition à des aérosols d'eaux chaudes générés lors de douche afin d'estimer l'incidence de la fièvre de Pontiac au sein de personnes âgées, dans un contexte non épidémique.

(iv) d'identifier et de quantifier les facteurs de risque pour les personnes âgées de développer la fièvre de Pontiac, afin de disposer d'un modèle de prédiction du risque de cette pathologie en relation avec les niveaux de *Legionella* dans l'eau et dans les aérosols.

L'estimation des concentrations de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires a été réalisée par des prélèvements réguliers aux points de douche de patients résidant dans 34 maisons de retraite de Lorraine. Cette étude s'est déroulée sur deux ans et demi, d'octobre 2003 à novembre 2005.

Il s'est avéré qu'un cinquième des établissements présentait des concentrations en *Legionella* cultivables supérieures à la limite réglementaire de 10^3 UFC.L^{-1}. En revanche, l'utilisation de la méthode d'hybridation *in situ* (FISH) a permis de détecter et de quantifier la population de légionelles dans plus de la moitié des réseaux d'eau chaudes des maisons de retraites volontaires.

Ces niveaux de concentrations en *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude sanitaire ont été mis en relation avec les données des diagnostics réseaux, mis à notre disposition. Ces données portaient sur l'observation de facteurs de risque de la présence de *Legionella* au niveau de quatre composantes du réseau d'eau : « *réseau d'alimentation en eau froide de la production d'eau chaude* », « *production d'eau chaude* », « *réseau de distribution d'eau chaude* » et « *points d'usage* ». Ces facteurs de risque ont ensuite été « quantifiés » par des scores de criticité allant de 1 à 4 selon un gradient de risque croissant avec la présence de *Legionella.* Nous avons ainsi constaté qu'aucun établissement n'avait une maîtrise totale du risque légionelles (aucun facteur de risque), mais qu'au contraire, les établissements étudiés présentaient des réseaux d'eau avec des facteurs de risque pour les quatre composantes du réseau d'eau. En mettant en relation ces scores de criticité du réseau d'eau et la présence de légionelles, il s'est avéré, pour des scores de criticité élevés ($\geq$3), que le risque de détecter des *Legionella* cultivables était fortement augmenté au niveau de la « *production d'eau chaude* » (O.R. = 26,0, I.C. à 95% = 1,3 – 503), du « *réseau de distribution d'eau chaude* » (O.R. = 224,0, I.C. à 95% = 3,9 à 12845,7) et dans une moindre mesure aux « *points d'usage* » (O.R. = 8,5, I.C. à 95% = 0,8 à 87,4). Ces résultats ne sont pas retrouvés lorsque la contamination en légionelles est appréciée par hybridation *in situ* sauf pour le score de criticité concernant les « points d'usage » (score $\geq$ 3 : O.R. = 10,8, I.C. à 95%= 0,99 à 116,1). Dans nos conditions expérimentales, il s'est donc avéré que la grille d'analyse des points critiques établie sur la base du diagnostic réseau est pertinente pour prédire le risque de présence de *Legionella* cultivables. Ce travail souligne par ailleurs que la maîtrise du risque à *Legionella* est multiparamétrique et doit être évaluée en tenant compte de la globalité des points critiques des réseaux d'eau. Cette phase du travail est en cours de soumission pour publication à la revue Water Research.

La mise en œuvre d'outils métrologiques pour la collecte et l'analyse des aérosols de légionelles était une étape préliminaire indispensable pour accéder à l'évaluation du niveau d'exposition des populations à des aérosols contaminés. En préambule à l'étude proprement dite dans les maisons de retraite de Lorraine, des essais réalisés en chambre d'aérosolisation et au niveau de douche ont visé à déterminer la méthodologie de collecte et d'analyse des aérosols de *Legionella.* Nous avons ainsi comparé l'influence, sur la cultivabilité de *Legionella* aéroportée, de trois principes de collecte de bioaérosols dans des conditions contrôlées d'une chambre d'aérobiocontamination. De manière concomitante à la culture, l'hybridation *in situ* a été testée sur les échantillons d'aérosol afin de connaître sa faisabilité sur la détection des aérosols bactériens. Dans nos conditions expérimentales, la combinaison méthodologique optimale de collecte-analyse de *Legionella* aéroportée a été obtenue avec l'utilisation de l'impaction sur milieu liquide et de l'hybridation *in situ,* que ce soit en banc d'aérosolisation ou lors de l'application de cette méthodologie au prélèvement d'aérosols de douche.

Cette étude préliminaire suggère donc que la caractérisation des expositions à cette bactérie pathogène est améliorée avec le couplage [impaction en milieu liquide – FISH]. Cette partie a fait l'objet d'une publication dans la revue Journal Environmental Monitoring.

Nous avons ensuite appliqué ces outils aux aérosols générés de 164 points de douche dans les 34 maisons de retraite participantes à l'étude. *Legionella* aéroportée a été détectée avec le couplage [impaction en milieu liquide – FISH] pour 29% des échantillons contre au mieux 3% pour le couplage [impaction sur milieu solide - culture]. Il semblait alors intéressant de tenter d'expliquer la contamination en *Legionella* aéroportée en la mettant en relation avec les teneurs de *Legionella* dans l'eau chaude de douche. Dans nos conditions d'observation, aucune influence des facteurs environnementaux (humidité relative, température de l'air, débit d'écoulement de l'eau, volume de l'espace douche) sur le transfert de *Legionella* dans l'aérosol n'a pu être établie. Cependant, pour tous les prélèvements d'aérosols positifs en *Legionella*, cette bactérie a été aussi détectée dans les eaux chaudes du même point de douche. Ainsi, à partir de ces données concernant 28,6% (47/164) des échantillons d'aérosols, nous avons conclu à un risque 6,8 fois plus élevé (I.C. à 95% = 2,6 - 47,1) de détecter *Legionella* dans l'aérosol quand la concentration dans l'eau chaude est supérieure à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1}.

Afin de mettre en relation l'exposition d'une population aux aérosols de *Legionella* et la survenue de l'infection bénigne à légionelles, la fièvre de Pontiac, une étude épidémiologique de quatre mois a été réalisée dans chacune des 34 maisons de retraite sur plus de 800 personnes âgées ; la voie d'exposition infectante étant l'aérosols d'eau contaminée lors de douche. La première étape a été de proposer une définition opérationnelle de la fièvre de Pontiac qui intègre à la fois les signes cliniques présentés par les personnes âgées et leur exposition potentielle à l'agent pathogène pendant les prises de douche. Cette définition est basée sur la survenue dans les trois jours suivant la prise de douche d'au moins un signe majeur (céphalées, myalgies, fièvre ou frissons) associé ou non à un signe mineur (vomissement, toux, vertiges, diarrhée ou asthénie). La durée de l'épisode de fièvre de Pontiac doit être comprise entre 2 et 8 jours. Enfin, *Legionella*, à l'origine de l'infection, doit être mesurée dans l'eau et/ou dans l'air de l'eau des douches du patient considéré. Cette partie des travaux a fait l'objet d'une publication dans la revue BMC Public Health.

L'étude épidémiologique a ainsi permis de diagnostiquer 30 cas de fièvre de Pontiac développés par 29 personnes âgées, de 16 maisons de retraite, correspondant à une densité d'incidence de 0,11 cas/personne.an (I.C. à 95% : 0,07-0,15).

Nous avons alors essayé d'identifier et de quantifier les facteurs de risque de la fièvre de Pontiac chez les personnes âgées. Deux approches ont été réalisées, d'une part l'identification et l'évaluation des facteurs de risque biologiques d'exposition, par la mesure des anticorps, et d'autre part, l'identification de facteurs de risque environnementaux de la maladie.

Les titres en anticorps anti-*Legionella* chez les personnes cas-fièvre de Pontiac ou saines ne sont pas statistiquement différents et les personnes cas ne présentent pas de manière systématique des titres élevées en anticorps. Ainsi, dans le cadre de notre étude, située dans un contexte non épidémique, les titres en anticorps ne peuvent pas être considérés comme de bons marqueurs d'exposition à *Legionella*.

L'analyse des antécédents de santé et des caractéristiques des personnes âgées-cas fièvre de Pontiac a montré que seules la présence de troubles cognitifs et la prise de corticothérapie sont des facteurs associés à la fièvre de Pontiac.

D'autre part, l'exposition à *Legionella* a été mise en relation avec le risque de développer la fièvre de Pontiac. Ainsi, une personne âgée exposée à :

- 10^4 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau, présente un facteur de risque de 2,5 (I.C. à 95% : 0,9 - 7,4) ;
- $\geq 10^5$ *Legionella*-FISH.L^{-1} eau, présente un facteur de risque de 2,3 (I.C. à 95% : 1,1 - 5,1) ;
- $\geq 10^3$ *Legionella*-FISH.L^{-1} air, présente un facteur de risque de 1,6 (I.C. à 95% : 0,8 - 3,5) de développer la fièvre de Pontiac, selon notre définition. Enfin, une relation dose-effet a été mise en évidence entre les concentrations de *Legionella* mesurées par hybridation *in situ* dans l'eau et la probabilité de survenue de la fièvre de Pontiac.

Le message principal extrait de ce travail de recherche est que la présence de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires, due à une gestion déficiente du réseau d'eau constitue un risque pour les personnes âgées *via* leur exposition aux aérosols d'eau de douche contaminée. Ce risque peut être observé par l'incidence de la fièvre de Pontiac. Mais, ce risque peut être modulé par certains caractères de l'état de santé des personnes âgées : la présence de troubles cognitifs ou la prise d'une corticothérapie.

La prédiction de la présence de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude par l'usage des données d'un diagnostic réseau basé sur des référentiels nationaux [DGS, 2002] est un aspect innovant de ce travail et s'inscrit dans une démarche de prévention du risque. En effet, à partir de l'évaluation de scores de criticité du réseau d'eau, nous avons pu qualifier et quantifier que plus les scores de criticité étaient élevés (présence de facteurs de risque) au niveau du réseau de distribution d'eau chaude et des points d'usage, plus *Legionella* avait de risques d'être présente dans les eaux chaudes.

L'autre aspect novateur de ces travaux est la mesure de *Legionella* aéroportée afin d'identifier au mieux les risques de contamination. En effet, la voie de transmission de la bactérie *Legionella* est l'aérosol alors qu'aujourd'hui la réglementation est basée sur la seule qualité de l'eau. D'ailleurs, au seuil réglementaire de 10^3 UFC-*Legionella*.L^{-1} eau, aucun risque de fièvre de Pontiac n'a été identifié, mais au-delà, à 10^4 UFC-*Legionella*.L^{-1} eau, pour la population âgée étudiée, une population sensible : ce seuil représente donc certainement un excès de risque. De ce fait, le seuil fixé par la réglementation française, 10^3 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau, est donc, dans le cadre de notre étude et au regard de nos résultats, protecteur pour la population générale face au risque épidémique de fièvre de Pontiac. De

plus, aucun cas de maladie du Légionnaire, qui n'était d'ailleurs pas l'objet de l'étude, n'a été identifié quelles que soient les concentrations en *Legionella* dans l'eau ; le seuil de 10^3 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau constitue donc, dans le cadre de notre étude, une réelle marge de sécurité à d'éventuelles maladies du Légionnaire.

A notre connaissance, c'est la première analyse reliant une mesure de *Legionella* aéroportée à une infection à légionelles, la fièvre de Pontiac. Ainsi, en ne considérant que les personnes-cas exposées à des aérosols contaminés par au minimum 10^3 *Legionella*-FISH.L^{-1} air, il s'est avéré que le risque de développer la fièvre de Pontiac était supérieur à 30 (E_4, O.R. = 31,1 ; E_5, O.R. = 35,25). Ce risque très élevé, obtenu pour des concentrations dans l'aérosol, est encore plus élevé que celui obtenu pour des concentrations dans l'eau chaude avec la même technique, FISH (O.R. = 2,3 ; I.C. à 95% : 1,1 - 5,1). Il semblerait donc que ce soit la voie d'exposition -aérosol- , qui pèse le plus sur le risque de fièvre de Pontiac, au regard de nos résultats, soit donc à privilégier dans des travaux ultérieurs sur le risque de fièvre de Pontiac ou tout autre infection liée à *Legionella*.

Bien entendu, ce travail mérite d'être confirmé par d'autres recherches : il serait intéressant de caractériser le générateur d'aérosols, le pommeau de douche, notamment par la taille et le nombre de trous sur la grille du pommeau, qui pourraient influer sur le transfert eau/air de la bactérie. L'analyse physico-chimique de l'eau et son influence sur la survie bactérienne et l'état de la bactérie au moment de l'aérosolisation mériteraient aussi de plus amples travaux.

L'étude des facteurs de risque de la fièvre de Pontiac a été réalisée à partir des teneurs de *Legionella* dans l'aérosol. Une analyse plus fine, faisant intervenir les titres en anticorps pourrait permettre de mieux définir le risque de fièvre de Pontiac. En effet, jusqu'à présent, seul le titre en anticorps le plus élevé parmi les 18 dosages réalisés était pris en compte, il serait intéressant d'identifier quelles sont les espèces qui sont le plus à risque.

Par ailleurs, nous n'avons considéré qu'une pathologie à *Legionella*, la fièvre de Pontiac, mais la plus grave à ce jour reste la maladie du Légionnaire. Il serait aussi intéressant de pouvoir expliquer pourquoi une forme clinique l'emporte sur l'autre, même si aujourd'hui quelques hypothèses sont avancées dans la littérature. Les cobayes sont souvent utilisés comme modèle pour étudier les pathologies dues à *Legionella* dans la littérature. Des expérimentations sur ces animaux soumis à des aérosols contaminés par différentes espèces de *Legionella*, enkystées ou non dans des amibes, seraient à envisager pour étudier la virulence de *Legionella*.

Enfin, pendant ces trois années de collecte de données au sein des maisons de retraite, nous avons aussi recueilli les informations relatives aux personnels soignants. Ils sont d'ailleurs plus sujets à l'exposition à *Legionella* dans le cadre professionnel par le biais de multiples aides quotidiennes à la prise de douche qu'ils apportent aux résidents.

Il serait donc tout aussi intéressant et novateur d'évaluer le risque, pour cette population saine, et *a priori* en bonne santé, dans un cadre professionnel, de développer la fièvre de Pontiac, dans un contexte non épidémique.

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOTHÈQUE NANCY

AB

Abu Kwaik Y. & Perderson L.L. (1996) The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection to macrophages, *Mol. Microbiol.*, **21**(3), 543-556.

Addiss D.G., Davis J.P., LaVenture L., Wand P.J., Hutchinson M.A. & McKinney R.M. (1989) Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower : evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila, Am. J. Epidemiol.*, **130**(3), 557-568.

Adeleke A.A., Fields B.S., Benson R.F., Daneshvar M.I., Pruckler J.M., Ratcliff R.M., Harrison T.G., Weyant R.S., Birtles R.J., Raoult D. & Halablab M.A. (2001) *Legionella drozanskii* sp. nov. and *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1151-1160.

Adeleke A.A., Pruckler J.M., Benson R.F., Rowbotham T., Halablab M.A. & Fields B.S. (1996) *Legionella*-like amebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease, *Emerg. Infect. Dis.*, **2**(3), 225-229.

A.F.N.O.R. (2006) Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par cocnentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), Norme AFNOR, Avril 2006.

A.F.N.O.R. (2004) Detection and enumeration of *Legionella* – Part 2 : direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts, Norme ISO 11731-2:2004, Mai 2004.

A.F.N.O.R. (2003) Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*, Norme AFNOR T90-431, Septembre 2003.

A.F.N.O.R. (1998) Recherche et dénombrement des *Legionella*, Norme ISO 11731:1998, Mai 1998.

Aguero-Rosenfeld M.E. & Edelstein P.H. (1988) Retrospective evaluation of the Du Pont radioimmunoassay kit for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigenuria in humans, *J. Clin. Microbiol.*, **26**(9), 1775-1778.

Alary M. & Joly J.R. (1992) Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by *Legionellae, J. Infect. Dis.*, **165**, 565-569.

Albrechtsen H.J. (2002) Microbiological investigations of rainwater and graywater collected for toilet flushing, *Water Sci. Technol.*, **46**(6-7), 311-316.

Alvarez A.J., Buttner M.P., Toranzos G.A., Dvorsky E.A., Toro A., Heikes T.B., Mertikas-Pifer L.E. & Stetzenbach L.D. (1994) Use of solid-phase PCR for enhanced detection of airborne microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 374-376.

Amann R.I., Ludwig W. & Schleifer K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143-149.

Amano K.I. & Williams J.C. (1983) Peptidoglycan of *Legionella pneumophila*: apparent resistance to lysozyme hydrolysis correlates with a high degree of peptide cross-linking, *J. Bacteriol.*, **153**(1), 520-526.

Armstrong T. (2004) A Quantitative Microbial Risk Assessment Model for Human Inhalation Exposure to *Legionella, Thèse de Sciences, Université Drexel, Philadelphie*, pp 211.

Atlas R.M., Williams J.F. & Huntington M.K. (1995) *Legionella* contamination of dental-unit waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(4), 1208-1213.

Aurell H., Catala P., Farge P., Wallet F., Le Brun M., Helbig J.H., Jarraud S. & Lebaron P. (2004) Rapid detection and enumeration of *Legionella pneumophila* in hot water systems by solid-phase cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(3), 1651-1657.

Aurell H., Etienne J., Forey F., Reyrolle M., Girardo P., Farge P., Decludt B., Campese C., Vandenesch F. & Jarraud S. (2003) *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France, *J. Clin. Microbiol.*, **41**(7), 3320-3322.

Axelsson-Olsson D., Waldenstrom J., Broman T., Olsen B. & Holmberg M. (2005) Protozoan Acanthamoeba polyphaga as a potential reservoir for Campylobacter jejuni, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(2), 987-992.

Bangsborg J.M., Uldum S., Jensen J.S. & Bruun B.G. (1995) Nosocomial legionellosis in three heart-lung transplant patients: case reports and environmental observations, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **14**(2), 99-104.

Barbaree J.M., Fields B.S., Feeley J.C., Gorman G.W. & Martin W.T. (1986) Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**(2), 422-424.

Barbotte E., Chemardin J., Blech M.F., Paquin J.L., Lance P. & Hartemann P. (2002) Deux ans et demi de surveillance environnementale de *Legionella* en Lorraine : premiers constats, premières solutions, *B.E.H.*, 37, 179-180.

Barker J. & Brown M.R. (1994) Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment, *Microbiology*, **140** (Pt 6), 1253-1259.

Baron P.A. & Willeke K. (1986) Respirable droplets from whirlpools: measurements of size distribution and estimation of disease potential, *Environ. Res.*, **39**(1), 8-18.

Baskerville A., Fitzgeorge R.B., Broster M., Hambleton P. & Dennis P.J. (1981) Experimental transmission of legionnaires' disease by exposure to aerosols of *Legionella pneumophila*, *Lancet*, **2**(8260-61), 1389-1390.

Batté M., Appenzeller B.M.R., Grandjean D. , Fass S., Gauthier V., Jorand F. , Mathieu L., Boualam M., Saby S. & Block J.C. (2003) Biofilms in Drinking Water Distribution Systems, *Rev. Environ. Sci. Biotech.*, **2**(2-4), 147-168.

Bej A.K., Mahbubani M.H. & Atlas R.M. (1991), Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(2), 597-600.

Bej A.K., Mahbubani M.H., Miller R., DiCesare J.L., Haff L. & Atlas R.M. (1990) Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water, *Mol. Cell. Probes*, **4**(5), 353-365.

Benhamou D., Bru J.P., Chidiac C., Etienne J., Léophonte P., Marty N., Poirier R. & Rouquet R.M. (2005) Légionellose : définition, diagnostic et traitement, *Med. Mal. Infect.*, **35**(1), 1-5.

Benin A.L., Benson R.F., Arnold K.E., Fiore A.E., Cook P.G., Williams L.K., Fields B. & Besser R.E. (2002) An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever : the need for enhanced surveillance of travel – associated legionellosis in the United States, *J. Infect. Dis.*, **185**(2), 237-243.

Benson R.F. & Fields B.S. (1998) Classification of the genus *Legionella*, *Semin. Respir. Infect.*, **13**(2), 90-99.

Berendt R.F. (1981) Influence of blue-green algae (cyanobacteria) on survival of *Legionella pneumophila* in aerosols, *Infect. Immun.*, **32**(2), 690-2.

Berendt R.F., Young H.W., Allen R.G. & Knutsen G.L. (1980) Dose-reponse of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*, *J. Infect. Dis.*, **141**(2), 186-192.

Berk S.G., Ting R.S., Turner G.W. & Ashburn R.J. (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba spp.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(1), 279-286.

Bert G. (2005) Legionellose prevention in the netherlands, *http://www.inece.org/conference/7/vol1/25_Groen.pdf*, 155-157.

Bezanson G., Burbridge S., Haldane D., Yoell C. & Marrie T. (1992) Diverse populations of *Legionella pneumophila* present in the water of geographically clustered institutions served by the same water reservoir, *J. Clin. Microbiol.*, **30**(3), 570-576.

Bhopal R. (1995) Source of infection for sporadic Legionnaires' disease: a review, *J. Infect.*, **30**(1), 9-12.

Bhopal R.S. (1991) A framework for investigating geographical variation in diseases, based on a study of Legionnaires' disease, *J. Public Health Med.*, **13**(4), 281-289.

Birtles R.J., Roxbotham T.J., Raoult D. & Harrison T.G. (1996) Phylogenetic diversity of intra-amoebal legionellae as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison, *Microbiology*, **142**, 3525-3530.

Blander S.J. & Horwitz M.A. (1991a) Vaccination with the major secretory protein of *Legionella* induces humoral and cell-mediated immune responses and protective immunity across different serogroups of *Legionella pneumophila* and different species of *Legionella*, *J. Immunol.*, **147**(1), 285-291.

Blander S.J. & Horwitz M.A. (1991b) Vaccination with *Legionella pneumophila* membranes induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of legionnaires' disease, *J. Clin. Invest.*, **87**, 1054-1059.

Blander S.J., Breiman R.F. & Horwitz M.A. (1989) A live avirulent mutant *Legionella pneumophila* vaccine induces protective immunity against lethal aerosol challenge, *J. Clin. Invest.*, **83**, 810-815.

Blander S.J. & Horwitz M.A. (1989) Vaccination with the major secretory protein of *Legionella pneumophila* induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of legionnaires' disease, *J. Exp. Med.*, **169**, 691-705.

Blatt S.P., Parkinson M.D., Pace E., Hoffman P., Dolan D., Lauderdale P., Zajac R.A. & Melcher G.P. (1993) Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition, *Am. J. Med.*, **95**(1), 16-22.

Blomquist G., Strom G. & Stromquist L.H. (1984) Sampling of high concentrations of airborne fungi, *Scand. J. Work Environ. Health*, **10**, 109-113.

Bohach G.A. & Snyder I.S. (1983) Cynobacterial stimulation of growth and oxygen uptake by *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**(2), 528-531.

Boldur I., Ergaz M., Mor G., Kazak R., Pik A. & Sompolinsky D. (1986) Exposure to *Legionella* in geriatric institutions, *Isr. J. Med. Sci.*, **22**(10), 728-32.

Bollin G.E., Plouffe J.F., Para M.F. & Hackmann B. (1985) Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water-faucets, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**(5), 1128-1131.

Bonnard M. (2001) Le risque biologique et la méthode d'évaluation du risque – Rapport final Unité d'Evaluation des Risques Sanitaires, INERIS, pp 70.

Borella P., Montagna M.T., Stampi S., Stancanelli G., Romano-Spica V., Triassi M., Marchesi I., Bargellini A., Tato D., Napoli C., Zanetti F., Leoni E., Moro M., Scaltriti S., Ribera D'Alcala G., Santarpia R. & Boccia S. (2005) *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(10), 5805-5813.

Borella P., Montagna T.M ., Romano-Spica V., Stampi S., Stancanelli G., Triassi M., Neglia R., Marchesi I., Fantuzzi G., Tato D., Napoli C., Quaranta G., Laurenti P., Leoni E., de Luca G., Ossi C., Moro M. & Ribera D'alcala G. (2004) *Legionella* Infection Risk from Domestic Hot Water, *Emerg. Infect. Dis*, **10**(3), 457-464.

Bornstein N. & Fleurette J. (1992) *Legionella, In* Manuel de bactériologie clinique, J. Freney, F. Renaud, W. Hansen & C. Bollet (ed.), 2nde édition, édition Elsevier, Paris, 1061-1087.

Bornstein N., Mercatello A., Marmet D., Surgot M., Deveaux Y. & Fleurette J. (1989) Pleural infection caused by *Legionella anisa*, *J. Clin. Microbiol.*, **27**(9), 2100-2101.

Bornstein N., Janin N., Bourguignon G., Surgot M. & Fleurette J. (1986) Prevalence of anti-*Legionella* antibodies in a healthy population and in patients with tuberculosis or pneumonia, *Isr. J. Med. Sci.*, **22**, 740-744.

Bornstein N., Fleurette J., Bosshard S., Bouvet C., Thouvenot D. & Aymard M. (1984) Evaluation de la fréquence des réactions sérologiques croisées entre *Legionella* et *Mycoplasma* ou *Chlamydia*, *Path. Biol.*, **32**(3), 165-168.

Borobio V., Martinez C. & Perea E.J. (1987) Prevalence of anti-*Legionella pneumophila* antibodies in various groups with different risk factors in Seville (Spain), *Eur. J. Epidemiol.*, **3**(4), 436-438.

Bosshardt S.C., Benson R.F. & Fields B.S. (1997) Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella, Microbiol. Pathogenesis*, **23**, 107-112.

Breiman R.F., Fields B.S., Sanden G.N., Volmer L., Meier A. & Spika J.S. (1990a) Association of shower use with legionnaires' disease, *JAMA,* **263**(21), 2924-2926.

Breiman R.F., Cozen W., Fields B.S., Mastro T.D., Carr S.J., Spika J.S. & Mascola L. (1990b) Role of air sampling in investigation of an outbreak of Legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser, *J. Infect. Dis.*, **161**, 1257-1261.

Breiman R.F. & Horwitz M.A. (1987) Guinea-pigs sublethally infected with aerosolized *Legionella pneumophila* develop humoral and cell-mediated immune responses and are protected against lethal aerosol challenge, *J. Exp. Med.*, **164**, 799-811.

Brenner D.J., Steigerwalt A.G., Epple P., Bibb W.F., McKinney R.M., Starnes R.W., Colville J.M., Selander R.K., Edelstein P.H. & Moss C.W. (1988) *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L.pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L.pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov., *J. Clin. Microbiol.*, **26**(9), 1695-1703.

Brenner D.J., Steigerwalt A.G. & McDade J.E. (1979) Classification of the Legionnaires' Disease Bacterium : *Legionella pneumophila*, genus novum, of the family *Legionellaceae*, family nova, *Ann. Intern. Med.*, **90**(4), 656-658.

Brieland J., Fantone J., Remick D.G., LeGendre M., McClain M. & Engleberg C. (1997a) The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmanella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaires' disease, *Infect. Immun.*, **65**(12), 5330-5333.

Brieland J., McClain M., LeGendre M. & Engleberg C. (1997b) Intrapulmonary *Hartmanella vermiformis*: *Legionella pneumophila* replication in a murine model of legionellosis, *Infect. Immun.*, **65**(11), 4892-4896.

Brieland J., McClain M., Heath L., Chrisp C., Huffnagle G., LeGendre M., Hurley M., Fantone J. & Engleberg C. (1996) Coinoculation with *Hartmanella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease, *Infect. Immun.*, **64**(7), 2449-2456.

Brooks T., Osicki R.A., Springthorpe V.S., Sattar S.A., Filion L., Abrial D. & Riffard S. (2004) Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters, *J. Tox. Environ. Health*, **67**, 1845-1859.

Brown C.M., Nuorti P.J., Breiman R.F., Hathcock A.L., Fields B.S., Lipman H.B., Llewellyn G.C., Hofmann J. & Cetron M. (1999) A community outbreak of Legionnaires'disease linked to hospital cooling towers : an epidemiological method to calculate dose of exposure, *Int. J. Epidemiol.*, **28**, 353-359.

Buchbinder S., Trebesius K. & Heesemann J. (2002) Evaluation of detection of *Legionella spp.* in water samples by fluorescence *in situ* hybridization, PCR amplification and bacterial culture, *Int. J. Med. Microbiol.*, **292**(3-4), 241-245.

Butler C.A., Street E.D., Hatch T.P. & Hoffman P.S. (1985) Disulfide-bonded outer membrane proteins in the genus *Legionella*, *Infect. Immun.*, **48**(1), 14-18.

Buttner M.P. & Stetzenbach L.D. (1991) Evaluation of Four Aerobiological Sampling Methods for the Retrieval of Aerosolized *Pseudomonas syringae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(4), 1268-1270.

Byrd J.J., Xu H.S. & Colwell R.R. (1991) Viable but nonculturable bacteria in drinking water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 875-878.

CD

Campèse C., Jarraud S., Bitar D., Maine C. & Che D. (2005) Les légionelloses survenues en France en 2004, *BEH*, 26, 129-132.

Campèse C., Jarraud S., Decludt B., Jacquier G. & Che D. (2004) Les légionelloses déclarées en France en 2003, *BEH*, 36-37, 174-176.

Campèse C., Che D., Maine C. & Decludt B. (2003) Les légionelloses déclarées en France en 2002, *BEH*, 32, 153-155.

Campèse C. & Decludt B. (2000) Les légionelloses déclarées en France en 1998, *BEH*, 12.

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

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

Catalan V., Moreno C., Dasi M.A., Munoz C. & Apraiz D. (1994) Nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in water, *Res. Microbiol.*, **145**(8), 603-610.

Cazalet C., Rusniok C., Brüggemann H., Zidane N., Magnier A., Ma L., Tichit M., Jarraud S., Bouchier C., Vandenesch F., Kunst F., Etienne J., Glaser P. & Buchrieser C. (2004), Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity, *Nat. Genet.*, **36**(11), 1165-1173.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005) Legionnaires'disease associated with potable water in a hotel –Ocean City, Maryland, October 2003- February 2004, *MMWR*, **54**, 165-168.

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

Chandler F.W., Thomason B.M. & Hébert B.S. (1980a) Flagella on legionnaires' disease in the human lung, *Ann. Intern. Med.*, **93**(5), 715-716.

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

Chandler F.W., Cole R.M., Hicklin M.D., Blackmon J.A. & Callaway C.S. (1979) Ultrastructure of the legionnaires's disease bacterium. A study using transmission electron microscopy, *Ann. Intern. Med.*, **90**,642-647.

Chang B., Kura F., Amemura-Maekawa J., Koizumi N. & Watanabe H. (2005) Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*, *Infect. Immun.*, **73**(7), 4272-4280.

Che D., Decludt B., Campese C. & Desenclos J.C. (2003) Sporadic cases of community acquired legionnaires' disease: an ecological study to identify new sources of contamination, *J. Epidemiol. Community Health*, **57**(6), 466-469.

Cianciotto N.P. (2001) Pathogenicity of *Legionella pneumophila*, *Int. J. Med. Microbiol.*, **291**, 331-343.

Cianciotto N.P., Stamos J.K. & Kamp D.W. (1995) Infectivity of *Legionella pneumophila mip* mutant for alveolar epithelial cells, *Curr. Microbiol.*, **30**(4), 247-250.

Cianciotto N.P., Eisenstein B.I., Mody C.H., Toews G.B. & Engleberg N.C. (1989) A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection, *Infect. Immun.*, **57**(4), 1255-1262.

Cielsielski C.A., Blaser M.J. & Wang W.L. (1986) Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics, *Infect. Immun.*, **51**(2), 397-404.

Cielsielski C.A., Blaser M.J. & Wang W.L. (1984) Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(5), 984-987.

Cirillo S.L.G., Bermudez L.E., El-Etr S.H., Duhamel G.E. & Cirillo J.D. (2001) *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence, *Infect. Immun.*, **69**(1), 508-517.

Cirillo S.L., Lum J. & Cirillo J.D. (2000) Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*, *Microbiology*, **146**, 1345-1359.

Cirillo J.D., Falkow S. & Tompkins L.S. (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion, *Infect. Immun.*, **62**(8), 3254-3261.

Coers J., Kagan J.C., Matthews M., Nagai H., Zuckman D.M. & Roy C.R. (2000) Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth, *Molecular Microbiology*, **38**(4), 719-736.

Coleman M.E. & Marks H.M. (1999) Qualitative and quantitative risk assessment, *Food Control*, 10, 289-297.

Colwell R.R. (2000) Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy, *J. Infect. Chemother.*, **6**, 121-125.

Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) (2005) Le risque lié aux Légionelles, Guide d'investigation et d'aide à la gestion, Paris.

Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) (2001) Gestion du risque lié aux Légionelles, Paris.

Cordes L.G., Fraser D.W., Skaliy P., Perlino C.A., Elsea W.R., Mallison G.F. & Hayes P.S. (1980) Legionnaires' disease outbreak at an Atlanta, Georgia, Country Club: evidence for spread from an evaporative condenser, *Am. J. Epidemiol.*, **111**(4), 425-431.

Cordes L.G. & Fraser D.W. (1980) Legionellosis : Legionnaires' disease ; Pontiac fever, *Med. Clin. North Am.*, **64**(3), 395-416.

Correia A.M., Goncalves G., Reis J., Cruz J.M. & Castro e Freitas J.A. (2001) An outbreak of legionnaires' disease in a municipality in northern Portugal, *Euro Surveill.*, **6**(7-8), 121-124.

Costa J., Tiago I., da Costa M.S. & Verissimo A. (2005) Presence and persistence of *Legionella spp.* in groundwater, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(2), 663-71.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. & Lappin-Scott H.M. (1995) Microbial biofilms, *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 711-45.

Cown W.B., Kethley T.W. & Fincher E.L. (1957) The critical-orifice liquid impinger as a sampler for bacterial aerosols, *Appl. Microbiol.*, **5**(2), 119-124.

Cox C.S. (1989) Airborne bacteria and viruses, *Sci. Prog.*, **73**(292), 469-499.

Darelid J., Lofgren S., Malmvall B.E., Olinder-Nielsen M.A., Briheim G. & Hallander H. (2003) *Legionella pneumophila* serogroup 1 antibody kinetics in patients with Legionnaires' disease: implications for serological diagnosis, *Scand. J. Infect. Dis.*, **35**(1), 15-20.

Davis G.S., Winn W.C., Gump D.W., Craighead J.M. & Beaty H.N. (1983) Legionnaires' pneumonia in guinea pigs and rats produced by aerosol exposure, *Chest*, **83**(5suppl), 15S-16S.

Davis G.S., Winn W.C., Gump D.W., Craighead J.E. & Beaty H.N. (1982) Legionnaires' pneumonia after aerosol exposure in guinea pigs and rats, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **126**(6), 1050-1057.

Declerck P., Verelst L., Duvivier L., Van Damme A. & Ollevier F. (2003) PCR as a test for the presence or absence of *Legionella* in (cooling) water, *Water Sci. Technol.*, **47**(3), 103-107.

Decludt B., Perrocheau A. & Cerase-Feurra V. (1999) Les légionelloses déclarées en France en 1997, *B.E.H.*, 6.

DeLong E.F., Wickham G.S. & Pace N.R. (1989) Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells, *Science*, **243**(4896), 1360-1363.

Den Boer J.W., Yzerman E.P., Schellekens J., Lettinga K.D., Boshuizen H.C., Van Steenbergen J.E., Bosman A., Van den Hof S., Van Vliet H.A., Peeters M.F., Van Ketel R.J., Speelman P., Kool J.L. & Conyn-Van Spaendonck M.A. (2002) A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999, *Emerg. Infect. Dis.*, **8**(1), 37-43.

Dennis P.J., Wright A.E., Rutter D.A., Death J.E. & Jones B.P.C. (1984) *Legionella pneumophila* in aerosols from shower baths, *J. Hyg. (Camb.)*, **93**(2), 349-353.

Dennis P.J. & Lee J.V. (1988) Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1, *J. Appl. Bacteriol.*, **65**(2), 135-141.

Dennis P.J., Green D. & Jones B.P. (1984) A note on the temperature tolerance of *Legionella*, *J. Appl. Bacteriol.*, **56**(2), 349-350.

Desai R., Welsh C., Summy M., Farone M. & Newsome A.L. (1999) The potential of *in s*itu hybridization and an immunogold assay to identify *Legionella* ssociations with others organisms, *J. Microbiol. Methods*, **37**, 155-164.

De Schrijver K., Van Bouwel E., Mortelmans L., Van Rossom P., De Beukelaer T., Vael C., Dirven K., Goossens H., Leven M. & Ronveaux O. (2002) An outbreak of legionnaires' disease among visitors to a fair in Belgium, 1999, *Euro Surveill.*, **5**(11), 115-119.

Direction Générale de la Santé (2005) Circulaire DGS/SD7A/DHOS/E4/DGAS/SD2/2005/493 du 28 octobre 2005 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées.

Direction Générale de la Santé (2002) Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243 du 22 avril 2002, relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.

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

Dominguez J.A., Gali N., Pedroso P., Fargas A., Padilla E., Manterola J.M. & Matas L. (1998) Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* Urin antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples, *J. Clin. Microbiol.*, **36**(9), 2718-2722.

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

Door J.P. & Blandin M.C. (2005) Le risque épidémique, Tome I, rapport de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifique set techniologiques, *http://www.assemblee-nationale.fr/12/pdf/rap-off/i2327-t1.pdf*, (consulté en avril 2006), pp 194.

Dowling J.N., Saha A.K. & Glew R.H. (1992) Virulence factors of the family *Legionellaceae*, *Microbiol. Rev.*, **56**(1), 32-60.

Durand K.T., Muilenberg M.L., Burge H.A. & Seixas N.S. (2002) Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration, *Ann. Occup. Hyg.*, **46**, 113-118.

Dutil S., Tessier S., Veillette M., Laflamme C., Meriaux A., Leduc A., Barbeau J. & Duchaine C. (2006) Detection of *Legionella* spp. by fluorescent *in situ* hybridization in dental unit waterlines, *J. Appl. Microbiol.*, **100**(5), 955-963.

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

EF

Edelstein P.H., Hu B., Higa F. & Edelstein M.A.C. (2003) *IvgA*, a novel *Legionella pneumophila* virulence factor, *Infect. Immun.*, **71**(5), 2394-2403.

Edelstein P.H., Edelstein M.A., Higa F. & Falkow S. (1999) Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**(14), 8190-8195.

Edelstein P.H. (1995) Antimicrobial chemotherapy for legionnaires' disease: a review, *Clin. Infect. Dis.*, **21** (Suppl 3), S265-S276.

Edelstein P.H. & Meyer R.D. (1984) Legionnaires' disease. A review, *Chest.*, **85**(1), 114-120.

Edelstein P.H. (1982) Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water, *J. Clin. Microbiol.*, **16**(4), 697-699.

Edelstein P.H. (1981) Improved semi-selective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens, *J. Clin. Microbiol.*, **14**(3), 298-303.

Eduard W., Lacey J., Karlsson K., Palmgren U., Ström G. & Blomquis G. (1990) Evaluation of methods for enumerating microorganisms in filter samples from highly contaminated occupational environments, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **51**(8), 427-436.

Elliott J.A., Johnson W. & Helms C.M. (1981) Ultrastructural localization and protective activity of a high-molecular-weight antigen isolated from *Legionella pneumophila*, *Infect. Immun.*, **31**(2), 822-824.

Engleberg N.C., Pearlman E., Dixon D. & Eisenstein B.I. (1986) Antibodies isolated by using cloned surface antigens recognize antigenically related components of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species, *J. Immunol.*, **136**(4), 1415-1417.

EPA (United States Environmental Protection Agency) (2001) *Legionella*: Drinking Water Health Advisory, Washington, pp 27.

EPA (United States Environmental Protection Agency) (1999) *Legionella*: Human Health Criteria Document, Washington, pp 122.

EPA (United States Environmental Protection Agency) (1997) Exposure Factors Handbook, site : http://www.epa.gov.

Exner M., Kramer A., Lajoie L., Gebel J., Engelhart S. & Hartemann P. (2005) Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities, *Am. J. Infect. Control*, **33**(5 Suppl 1), S26-S40.

Exner M., Kramer M.H. & Pleischl S. (2002) Strategies for prevention and control of legionnaires'disease in germany, In *Legionella*, 444 pages, Washington : 325-29, Editors : R. Marre, Y Abu Kwaik, C. Bartlett, N.P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker, P.C. Lück.

Fabbi M., Pastoris M.C., Scanziani E., Magnino S. & Di Matteo L. (1998) Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf, *J. Clin. Microbiol.*, **36**(7), 1942-1947.

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

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

Fegatella F., Lim J., Kjelleberg S. & Cavicchioli R. (1998) Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4433-4438.

Fenstersheib M.D., Miller M., Diggins C., Liska S., Detwiler L., Werner S.B., Lindquist D., Thacker W.L. & Benson R.F. (1990) Outbreak of Pontiac fever dur to *Legionella anisa, Lancet*, 336, 35-37.

Fernandez R.C., Logan S.M., Lee S.H.S. & Hoffman P.S. (1996) Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence, *Infect. Immun.*, **64**(6), 1968-1976.

Fields B.S., Benson R.F. & Besser R.E. (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clin. Microbiol.*, **15**(3), 506-526.

Fields B.S., Haupt T., Davis J.P., Arduino M.J., Miller P.H. & Butler J.C. (2001) Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin, *J. Infect. Dis.*, **184**(10), 1289-1292.

Fields B.S. (1996) The molecular ecology of *legionellae*, *Trends in Microbiol.*, **4**(7), 286-290.

Finlay B.J., Tellez C. & Esteban G. (1993) Diversity of free-living ciliates in the sandy sediment of a Spanish stream in winter, *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2855–2863.

Finnerty W.R., Makula R.A. & Feeley J.C. (1979) Cellular lipids of the legionnaires'disease bacterium, *Ann. Intern. Med.*, **90**, 631-634.

Fitzgeorge R.B., Baskerville A., Broster M., Hambleton P. & Dennis P.J. (1983) Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence : comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection, *J. Hyg. (Lond)*, **90**(1), 81-89.

Fiume L., Bucca Sabattini M.A. & Poda G. (2005) Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays, *Lett. Appl. Microbiol.*, **41**(6), 470-475.

Flesher A.R., Susumu I., Bernard J.M. & Dennis L.K. (1979) The cell envelope of the legionnaires'disease bacterium, *Ann. Intern. Med.*, **90**, 628-630.

Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J., Tison D.L. & Pope D.H. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(1), 9-16.

Fox A., Rogers J.C., Fox K.F., Schnitzer G., Morgan S.L., Brown A. & Aono R. (1990) Chemotaxonomic differentiation of *Legionellae* by detection and characterization of aminodideoxyhexoses and other unique sugars using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Clin. Microbiol.*, **28**(3), 546-552.

Franzin L. & Scramuzza F. (1995) Prevalence of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antibodies in blood donors, *Eur. J. Epidemiol.*, **11**, 475-478.

Fraser D.W., Tsai T.R., Orenstein W., Parkin WE, Beecham H.J., Sharrar R.G., Harris J., Mallison G.F., Marin S.M., McDade J.E., Shepard C.C. & Brachman P.S. (1977) Legionnaires' disease : description of an epidemic pneumonia, *N. Engl. J. Med.*, **297**(22), 1189-1197.

Fraser D.W., Deubner D.C., Hill D.L. & Gilliam D.K. (1979) Nonpneumonic, short-incubation-period Legionellosis (Pontiac fever) in men who cleaned a stem turbine condenser, *Science*, **205**(4407), 690-691.

Freney J., Renaud F., Hansen W. & Bollet C. (2000) Précis de bactériologie clinique, Edition ESKA, Lavis, Italie, pp 1691.

Friedman S., Spitalny K., Barbaree J., Faur Y & McKinney R. (1987) Pontiac fever outbreak associated with a cooling tower, *Am. J. Public Health*, **77**(5), 568-572.

Fry N.K., Rowbotham T.J., Saunders N.A. & Embley T.M. (1991) Direct amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amoebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia, *FEMS Microbiol. Lett.*, **77**(5), 568-572.

Fuchs B.M., Wallner G., Beisker W., Schwippl I., Ludwig W. & Amann R. (1998) Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(12), 4973-4982.

GH

Gabay J.E., Blake M., Niles W.D. & Horwitz M.A. (1985) Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin, *J. Bacteriol.*, **162**(1), 85-91.

Gabay J.E. & Horwitz M.A. (1985) Isolation and characterization of the cytoplasmic and outer membranes of the legionnaires'disease bacterium (*Legionella pneumophila), J. Exp. Med.*, **161**, 409-422.

Gao L.Y., Harb O.S. & Abu Kwaik Y. (1997) Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa, *Infect. Immun.*, **65**(11), 4738-4746.

Garrigues M.L. & Véron M. (1987) Gas-liquid chromatography in microbiological diagnosis, *Ann. Biol. Clin.* (Paris), **45**(2), 135-143.

Garrity G.M., Brown A. & Vickers R.M. (1980) *Tatlockia* and *Fluoribacter*: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumphila*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**(4), 609-614.

Girod J.C., Reichman R.C., Winn W.C., Klaucke D.N., Vogt R.L. & Dolin R. (1982) Pneumonic and nonpneumonic forms of legionellosis. The result of a common-source exposure to *Legionella pneumophila*, *Arch. Intern. Med.*, **142**(3), 545-547.

Glick T.H., Gregg M.B., Berman B., Mallison G., Rhodes W.W. & Kassanoff I. (1978) An epidemic of unknown etiology in a health department : I. Clinical and epidemiologic aspects, *American Journal of Epidemiology*, **107**(2), 149-160.

Goff G.D., Splendlove J.C., Adams A.P. & Nicholes P.S. (1973) Emission of microbial aerosols from sewage treatment plants that use trickling filters, *Health Serv. Rep.*, **88**(7), 640-652.

Goldberg D.J., Emslie J.A., Fallon R.J., Green S.T. & Wrench J.G. (1992) Pontiac fever in children, *Pediatr. Infect .Dis. J.*, **11**(3), 240-241.

Görner P., Fabriès J.F., Duquenne P., Witschger O. & Wrobel R. (2006) Bioaerosol sampling by a personal rotating cup sampler CIP 10-M, *J. Environ. Monit.*, **8**, 43-48.

Götz H.M., Tegnell A., De Jong B., Broholm K.A., Kuusi M., Kallings I. & Ekdahl K. (2001) A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden, *Epidemiol. Infect.*, **126**(2), 241-247.

Graman P., Quinlan G. & Rank J. (1997) Nosocomial legionellosis traced to a contaminated ice machine, *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, **18**, 637-640.

Green P.N. (1993) Efficacy of biocides on laboratory-generated *Legionella* biofilms, *Lett. Appl. Microbiol.*, **17**, 158-161.

Green P.N. & Pirrie R.S. (1993) A laboratory apparatus for the generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms, *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 388-393.

Gregersen P., Grunnet K., Uldum S.A., Andersen B.H. & Madsen H. (1999) Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry, *Scand. J. Work Environ. Health*, **25**(3), 291-295.

Greub G. & Raoult D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae, *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**(2), 413-433.

Grimm D., Merkert H., Ludwig W., Schleifer K.H., Hacker J. & Brand B.A. (1998) Specific detection of *Legionella pneumophila* construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(7), 2686-2690.

Götz H.M., Tegnell A., de Jong B., Broholm K.A., Kuusi M., Kallings I. & Ekdahl K. (2001) A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Norther Sweden, *Epidemiol. Infect.*, **126**(2), 241-247.

Griffiths W.D., Stewart I.W., Reading A.R. & Futter S.J. (1996) Effect of aerosolization, growth phase and residence time in spray and collection fluids on the culturability of cells and spores, *J. Aerosol. Sci.*, **27**, 803-820.

Guide des bonnes pratiques (2001) *Legionella* et tours aéroréfrigérantes, *http://perso.orange.fr/protec/Documents%20pdf/guide%20des%20bonnes%20pratiques.pdf* (consultée en juillet 2006), pp54.

Ha T.L., Deloge-Abarkan M., Mathieu L. & Robine E. (2005) Metrology of *Legionella* aerosols : from laboratory approach to a field evaluation of sampling and detection methods, *Proceedings of the 6th International Conference on Legionella*, Chicago.

Ha T.L. (2005) Étude de l'aérosol de *Legionella pneumophila*, *Thèse de Sciences*, *Université Paris 12*, pp 145.

Haas C.N., Rose J.B. & GERBA C.P. (1999) Quantitative microbial risk assessment, Wiley, New York, pp 464.

Habicht W. & Muller H.E. (1988) Occurrence and parameters of frequency of *Legionella* in warm water systems of hospitals and hotels in Lower Saxony, *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [B]*, **186**(1), 79-88.

Hall-Stoodley L. & Stoodley P. (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens, *Trends Microbiol.*, **13**(1), 7-10.

Hambleton P., Broster M.G., Dennis P.J., Henstridge R., Fitzgeorge R. & Conlan J.W. (1983) Survival of virulent *Legionella pneumophila* in aerosols, *J. Hyg. (Lond)*, **90**(3), 451-460.

Hammer B.K. & Swanson M.S. (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp, *Molecular Microbiol.*, **33**(4), 721-731.

Harb O.S. & Abu Kwaik Y. (2000) Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (*milA*) of *Legionella pneumophila, Infect. Immun.*, **68**(1), 368-376.

Hayden R.T., Uhl J.R., Qian X., Hopkins M.K., Aubry M.C., Limper A.H., Lloyd R.V. & Cockerill F.R. (2001) Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, *in situ* hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture, *J. Clin. Microbiol.*, **39**(7), 2618-2626.

Heath C.H., Grove D.I. & Looke D.F. (1996) Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**(4), 286-290.

Hébert C.A. (1981) Hippurate hydrolysis by *Legionella pneumophila*, *J. Clin. Microbiol.*, **13**(1), 240-242.

Héchard Y., Ferraz S., Bruneteau E., Steinert M. & Berjeaud J.M. (2005) Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide, *FEMS Microbiology Letters*, **252**, 19-23.

Hedges L.J. & Roser D.J. (1991) Incidence of *Legionella* in the urban environment in Australia, *Wat. Res.*, **25**(4), 393-399.

Heidelberg J.F., Shahamat M., Levin M., Rahman I., Stelma G., Grim C. & Colwell R.R. (1997) Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3585-3588.

Helbig J.H., Bernander S., Castellani Pastoris M., Etienne J., Gaia V., Lauwers S., Lindsay D., Luck P.C., Marques T., Mentula S., Peeters M.F., Pelaz C., Struelens M., Uldum S.A., Wewalka G. & Harrison T.G. (2002) Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **21**(10), 710-716.

Heldal K., Skogstad A. & Eduard W. (1996) Improvements in the quantification of airborne micro-organisms in the farm environment by epifluorescence microscopy, *Ann. Occup. Hyg.*, **40**, 437-447.

Heller R., Holler C., Sussmuth R. & Gundermann K.O. (1998) Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**(1), 64-68.

Helms C.M., Viner J.P., Weisenburger D.D., Chiu L.C., Renner E.D. & Johnson W. (1984) Sporadic legionnaires' disease : clinical observations on 87 nosocomial and community-acquired cases, *Am. J. Med. Sci.*, **288**(1), 2-12.

Henningson E.W., Krocova Z., Sandström G. & Forsman M. (1998) Flow cytometric assessment of the survival ratio of *Francisella tularensis* in aerobiological samples, *FEMS Microbiology Ecology*, **25**, 241-249.

Herwaldt L.A., Gorman G.W., McGrath T. Toma S., Brake B., Hightower A.W., Jones J., Reingold A.L., Boxer P.A., Tang P.W., Moss C.W., Wilkinson H., Brenner D.J., Steigerwalt A.G. & Broome C.V. (1984) A new *Legionella* species, *Legionella feeleii* species nova, causes Pontiac fever in an automobile plant, *Ann. Intern. Med.*, **100**(3), 333-338.

Hess G.E. (1965) Effects of oxygen on aerosolized *Serratia marcescens*, *Appl. Microbiol.*, **13**(5), 781-787.

Heudorf U., Hentschel W., Hoffmann M., Lück C. & Schubert R. (2002) Prevalence of positive antibody titers against *Legionellae* in two residential populations with different *Legionella* contaminations in their hot water systems, In *Legionella*, 444 pages, Washington : 325-29, Editors : R. Marre, Y Abu Kwaik, C. Bartlett, N.P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker, P.C. Lück.

Higa F. & Edelstein P.H. (2001) Potential virulence role of the *Legionella pneumophila ptsP*, *Infect. Immun.*, **69**(8), 4782-4789.

Hindhal M.S. & Iglewski B.H. (1986) Outer membrane proteins from *Legionella pneumophila* serogroups and other *Legionella* species, *Infect. Immun.*, **51**(1), 94-101.

Hindhal M.S. & Iglewski B.H. (1984) Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane, *J. Bacteriol.*, **159**(1), 107-113.

Hlady W.G., Mullen R.C., Mintz C.S., Shelton B.G., Hopkins R.S. & Daikos G.L. (1993) Outbreak of Legionnaire's disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology, *Am. J. Epidemiol.*, **138**(8), 555-562.

Hodgson M. & Casey B.J. (1998) Prevalence of *Legionella* Bacteria in Building Water Systems, *http://www.claytongrp.com/legion_art.html.*

Hoebe C.J. & Kool JL. (2000) Control of *legionella* in drinking-water systems, *Lancet*, **355**(9221), 2093-2094.

Hoen B., Kessler M., Hestin D. & Mayeux D. (1995) Risk factors for bacterial infections in chronic haemodialysis adult patients: a multicentre prospective survey, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **10**(3), 377-81.

Hookey J.V., Saunders N.A., Fry N.K., Birtles R.J. & Harrison T.G. (1996) Phylogeny of *Legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**(2), 526-531.

Horng Y.T., Soo P.C., Shen B.J., Hung Y.L., Lo K.Y., Su H.P., Wei J.R., Hsieh S.C., Hsueh P.R. & Lai H.C. (2006) Development of an improved PCR-ICT hybrid assay for direct detection of *Legionellae* and *Legionella pneumophila* from cooling tower water specimens, *Water Res.*, **40**(11), 2221-2229.

Hubert B., Infuso A. & Ledrans M. (1997) Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose, circulaire DGS n° 97/311, *BEH*, 20-22.

Hughes M.S. & Steele T.W. (1994) Occurrence and distribution of *Legionella* species in composted plant materials, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(6), 2003-2005.

Huhn G.D., Adam B., Ruden R., Hilliard L., Kirkpatrick P., Todd J., Crafts W., Passaro D. & Dworkin M.S. (2005) Outbreak of travel-related pontiac fever among hotel guests illustrating the need for better diagnostic tests, *J. Travel Med.*, **12**(4), 173-179.

Hume R.D. & Hann W.D. (1984) Growth relationships of *Legionella pneumophila* with green algae (Chlorophyta), p 323-324, *In* Thornsberry C., Balows A., Feeley J.C. & Jakubowski W. (ed.), *Legionella* : Proceedings of the 2nd International Symposium, Atlanta, Georgia. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Hunt D.A., Cartwright K.A., Smith M.C., Middleton J., Bartlett C.L., Lee J.V., Dennis P.J. & Harper D. (1991) An outbreak of Legionnaires' disease in Gloucester, *Epidemiol. Infect.*, **107**(1), 133-141.

Hussong D., Colwell R.R., O'Brien M., Weiss E., Pearson A.D., Weiner R.M. & Burge W.D. (1987) Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media, *Bio/Technology*, 5, 947-950.

IJ

Infuso A., Hubert B. & Etienne J. (1998) La sous-déclaration de la légionellose en France : pour une surveillance plus active, *BEH*, 38.

Ishimatsu S., Miyamoto H., Hori H., Tanaka I. & Yoshida S. (2001) Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower, *Ann.Occup. Hyg.*, **45**(6), 421-427.

Israeli E., Gitelman J. & Lighthart B. (1994) Death mechanisms in microbial bioaerosols with special reference to thefreeze-dried analog, pp167-191, *In* Lighthart B. and Mohr A.J. (ed.), Atmospheric microbial aerosols, theory and applications. Chapman and Hall, Inc., New York.

James B.W., Mauchline W.S., Fitzgeorge R.B., Dennis P.J. & Keevil C.W. (1995) Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*, *Infect. Immun.*, **63**(11), 4224-4230.

Jarraud S., Reyrolle M. & Etienne J. (2000) *Legionella* et Légionellose, *In Précis de bactériologie clinique*, ESKA Editor, 1389-1405.

Jaulhac B., Nowicki M., Meunier O., Prevost G., Piemont Y., Fleurette J. & Monteil H. (1992) Detection of *Legionella spp.* in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification, *J. Clin. Microbiol.*, **30**(4), 920-924.

Jensen P.A. & Schafer M.P. (1998) Chapter J: Sampling and characterization of bioaerosols, *NIOSH Manual of Analytical methods*, 82-112.

Jensen P.A., Lighthart B., Mohr A.J. & Shaffer B.T. (1994) Instrumentation used with microbial bioaerosols, pp226-284, *In* Lighthart B. and Mohr A.J. (ed.), Atmospheric microbial aerosols, theory and applications. Chapman and Hall, Inc., New York.

Jepras R.I., Fitzgeorge R.B. & Baskerville A. (1985) A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs, *J Hyg (Lond)*, **95**(1), 29-38.

Jernigan D.B., Hofmann J., Cetron M.S., Genese C.A., Nuorti J.P., Fields B.S., Benson R.F., Carter R.J., Edelstein P.H., Guerrero I.C., Paul S.M., Lipman H.B. & Breiman R. (1996) Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa, *Lancet*, **347**, 9000, 494-499.

Jernigan D.B. (2001) Electronic laboratory-based reporting: opportunities and challenges for surveillance, *Emerg. Infect. Dis.*, **7**(3), 538.

Johnson W., Pesanti E. & Elliott J. (1979) Serospecificity and opsonic activity of antisera to *Legionella pneumophila*, *Infect. Immun.*, **26**(2), 698-704.

Joly P., Falconnet P.A., Andre J., Weill N., Reyrolle M., Vandenesch F., Maurin M., Etienne J. & Jarraud S. (2006) Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(4), 2801-2808.

Jones T.F., Benson R.F., Brown E.W., Rowland J.R., Crosier S.C. & Schaffner W. (2003) Epidemiologic investigation of a restaurant-associated outbreak of pontiac fever, *Clin. Infect. Dis.*, **37**, 1292-1297.

Joseph C.A. (2004) Legionnaires'disease in Europe, *Epidemiol. Infect.*, **132**, 417-424.

Joshi A.D. & Swanson M.S. (1999) Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits, *Infect. Immun.*, **67**(8), 4134-4142.

Journal Officiel de la République Française (2004) Loi n° 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique.

Journal Officiel de la République Française (2001) Décret no 2001-671 du 26 juillet 2001 relatif à la lutte contre les infections nosocomiales dans les établissements de santé et modifiant le code de la santé publique, *JORF*, 28 juillet, 173, 12142.

Journal Officiel de la République Française (1998) Liste des agents biologiques pathogènes, modifiée de l'arrêté du 18 juillet 1994, *JORF*, 22 juillet, 11207-11208.

Joux F. & Lebaron P. (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level, *Microbes Infect.*, **2**(12), 1523-1535.

Juozaitis A., Willeke K., Grinshpun S.A. & Donnelly J. (1994) Impaction onto a gliss slide or agar versus impingement into a liquid for the collection and recovery of airborne microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(3), 861-870.

KL

Katz S.M., Habib W.A., Hammel J.M. & Nash P. (1982) Lack of airborne spread of infection by *Legionella pneumophila* among guinea pigs, *Infect. Immun.*, **38**(2), 620-622.

Kaufmann A.F., McDade J.E., Patton C.M., Bennett J.V., Skaliy P., Feeley J.C., Anderson D.C., Potter M.E., Newhouse V.F., Gregg M.B. & Brachman P.S. (1981) Pontiac fever : isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission, *Am. J. Epidemiol.*, **114**(3), 337-47.

Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R. & Barer M.R. (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues, *Antonie Van Leeuwenhoek,* **73**(2), 169-87.

Keller D.W., Hajjeh R., DeMaria A., Fields B.S., Pruckler J.M., Benson R.S., Kludt P.E., Lett S.M., Mermel L.A., Giorgio C. & Breiman R.F. (1996) Community outbreak of Legionnaires' disease: an investigation confirming the potential for cooling towers to transmit *Legionella* species, *Clin. Infect. Dis.*, **22**, 257-261.

Kemp P.F., Lee S. & Laroche J. (1993) Estimating the Growth Rate of Slowly Growing Marine Bacteria from RNA Content, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2594-2601.

Kerkhof L. & Kemp P. (1999) Small ribosomal RNA content in marine Proteobacteria during non-steady-state growth, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **30**, 253-260.

Kilvington S. & Price J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba* polyphaga following chlorine exposure, *J. Appl .Bacteriol.*, **68**(5), 519-525

Kim M.J., Sohn J.W., Park D.W., Park S.C. & Chun B.C. (2003) Characterization of a lipoprotein common to *Legionell*a species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease, *J. Clin. Microbiol.*, **41**(7), 2974-2979.

Kliment V. (1973) Similarity and dimensional analysis, evaluation of aerosol deposition in the lungs of laboratory animals and mans, *Folia Morphol.*, **21**(1), 59-64.

Klont R.R., Rijs A.J., Warris A., Sturm P.D., Melchers W.J. & Verweij P.E. (2006) *Legionella pneumophila* in commercial bottled mineral water, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **47**(1), 42-44.

Kohler R.B., Winn W.C. & Wheat L.J. (1984) Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires, *J. Clin. Microbiol. Disease*, **20**(4):605-607.

Koide M., Arakaki N. & Saito A. (2001) Distribution of *Legionella longbeachae* and other *legionellae* in Japanese potting soils, *J. Infect. Chemother.*, **7**(4), 224-227.

Koide M., Saito A., Okazaki M., Umeda B. & Benson R.F. (1999) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting soils in Japan, *Clin. Infect. Dis.*, **29**(4), 943-944.

Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.N., Schreckenberger P.C. & Washington C.W. (1997) *Legionella*, p 473-489, *In* Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Fifth edition.

Kramer M.J. & Ford T.E. (1994) Legionellosis : ecological factors of an environmentally 'New' disease, *Zbl. Hyg.*, **195**, 470-482.

Krinos C., High A.S. & Rodgers F.G. (1999) Role of the 25kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos, *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 237-244.

Kuiper M.W., Wullings B.A., Akkermans A.D.L., Beumer R.R. & 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**(11), 6826-6833.

Kusnetsov J.M., Jousimies-Somer H.R., Nevalainen A.I. & Martikainen P.J. (1994) Isolation of *Legionella* from water samples using various culture methods, *J. Appl. Bacteriol.,* **76,** 155-162.

Kwaik Y.A. & Pederson L.L. (1996) The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages, *Mol. Microbiol.,* **21**(3), 543-556.

La Scola B., Birtles R.J., Greub G., Harrison T.J., Ratcliff R.M. & Raoult D. (2004) *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 699-703.

Lambert M.A. & Moss C.W. (1989) Cellular fatty acid compositions and isoprenoïd quinone contents of 23, *Legionella* species, *J. Clin. Microbiol.*, **27**(3), 465-473.

Lange J.L., Thorne P.S. & Lynch N. (1997) Application of flow cytometry and fluorescent *in situ* hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(4), 1557-1563.

Lebaron P., Servais P., Agogué H., Courties C. & Joux F. (2001) Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems?, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(4), 1775-1782.

Leclerc H., Gaillard J.L. & Simonet M. (1995) Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien, Doin Editeurs, 535pp.

Leclerc H. (2006) Les *Legionella* : de l'environnement à la maladie chez l'homme, *Eur. J. Wat. Qual.*, **37**(1), 9-20.

Lee J.V. & Joseph C. (2002) Guidelines for invetigating single cases of legionnaires' disease, *Commun. Dis. Public Health*, **5**(2), 157-162.

Lee T.C., Stout J.E. & Yu V.L. (1988) Factors predisposing to *Legionella pneumophila* colonization in residential water systems, *Arch. Environ. Health,* **43**(1), 59-62.

Lejeune P. (2003) Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it, *Trends Microbiol.*, **11**(4), 179-184.

Lembke L.L., Kniseley R.N., Van Nostrand R.C. & Hale M. D. (1981) Precision of the all-glass impinger and the andersen microbial impactor for air sampling in solid-waste handling facilities, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 222-225.

Leoni E., De Luca G., Legnani P.P., Sacchetti R., Stampi S. & Zanetti F. (2005) *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems, *J. Appl. Microbiol.*, **98**(2), 373-379.

Leoni E., Legnani P.P., Bucci Sabattini M.A. & Righi F. (2001) Prevalence of *Legionella spp.* in swimming pool environment, *Water Res.,* **35**(15), 3749-3753.

Levi K., Smedley J. & Towner K.J. (2003) Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in hospital and environmental water samples, *Clin. Microbiol. Infect.*, **9**(7), 754-758.

Lighthart B. & Mohr A.J. (1994) Atmospheric microbial aerosols, theory and applications. Chapman and Hall, Inc., New York, pp 395.

Li C.S. & Lin Y.C. (1999) Sampling performance of impactors for bacterial bioaerosols, *Aerosol Sci. Technol.*, **30**, 280-287.

Lin Y.S., Vidic R.D., Stout J.E. & Yu V.L. (2002) Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(6), 2711-2715.

Lo Presti F. (1998) Différentiations spécifique et intraspécifique des *Legionella* par différents outils moléculaires, et description de nouveaux taxons, *Thèse de Sciences, Université Claude Bernard, Lyon I*, pp 279.

Lüttichau H.R., Vinther C., Uldum S.A., Moller J., Faber M. & Jensen J.S. (1998) An outbreak of Pontiac fever among children following the use of a whirlpool, *Clin. Infect. Dis.*, **26**(6), 1374-1378.

Lye D., Fout S., Crout S.R., Danielson R., Thio C.L. & Paszko-Kolva C.M. (1997) Survey of ground, surface, and potable waters for the presence of *Legionella* species by Enviroamp^{R} PCR *Legionella* kit, culture, and immunofluorescent staining, *Water Res.*, **31**(2), 287-293.

MN

MacDonell M.T & Colwell R.R. (1987) The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*, *Nucl. Acids Res.*, **15**, 1335.

Mahbubani M.A., Bej A.K., Miller R., Haff L., DiCesare J. & Atlas R.M. (1990) Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods, *Mol. Cell. Probes*, **4**(3), 175-187.

Mahoney F.J., Hoge C.W., Farley T.A., Barbaree J.M., Breiman R.F., Benson R.F. & McFarland L.M. (1992) Community wide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine, *J. Infect. Dis.*, **165**(4), 736-739.

Mauchline W.S., James B.W., Fitzgeorge R.B., Dennis P.J. & Keevil C.W. (1994) Growth temperature reversibly modulates the virulence of *Legionella pneumophila*, *Infect. Immun.*, **62**(7), 2995-2997.

Maiwald M., Kissel K., Srimuang S., von Knebel Doeberitz M. & Sonntag H.G. (1994) Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of legionellas in hospital water samples, *J. Appl. Bacteriol.*, **76**(3), 216-225.

Malan A.K., Martins T.B., Jaskowski T.D., Hill H.R. & Litwin C.M. (2003) Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6, *J. Clin. Microbiol.*, **41**(7), 3060-3063.

Mangione E.J., Remis R.S., Tait K.A., McGee H.B., Gorman G.W., Wentworth B.B., Baron P.A., Hightower A.W., Barbaree J.M. & Broome C.V. (1985) An outbreak of Pontiac fever related to whirlpool use, Michigan 1982, *JAMA*, **253**(4), 535-539.

Manz W., Amann R., Szewyk R., Szewzyk U., Strenström T.A., Hutzler P. & Schleifer K.H. (1995) *In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy, *Microbiology*, **141**, 29-39.

Marmet D., Bornstein N. & Fleurette J. (1988) Identification des *Legionella* par analyse des acides gras en chromatographie phase gazeuse (CPG) et des ubiquinones en chromatographie liquide haute performance (CLHP), *Ann. Biol. Clin.*, 46, 371-375.

Marshall B., Flynn P., Kamely D. & Levy S.B. (1988) Survival of *Escherichia coli* with and without ColE1::Tn5 after aerosol dispersal in a laboratory and a farm environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1776-1783.

Marston B.J., Lipman H.B. & Breiman R.F. (1994) Surveillance for Legionnaires' disease, *Arch. Intern. Med.*, **154**, 2417-2422.

Marthi B., Fieland V.P., Walter M. & Seidler R.J. (1990) Survival of bacteria during aerosolization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3463-3467.

Martinelli F., Carasi S., Scarcella C. & Speziani F. (2001) Detection of *Legionella pneumophila* at thermal spas, *New Microbiol.*, **24**(3), 259-264.

Martiny A.C., Jorgensen T.M., Albrechtsen H.J., Arvin E. & Molin S. (2003) Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(11), 6899-6907.

Mathieu L., Robine E., Deloge-Abarkan M., Ritoux S., Pauly D., Hartemann P. & Zmirou-Navier D. (2006) *Legionella* Bacteria in Aerosols: Sampling and Analytical Approaches Used during the Legionnaires Disease Outbreak in Pas-de-Calais, *J. Infect. Dis.*, **193**(9), 1333-1335.

Mauchline W.S., James B.W., Fitzgeorge R.B., Dennis P.J., Keevil C.W. (1994) Growth temperature reversibly modulates the virulence of *Legionella pneumophila*, *Infect. Immun.*, 62(7), 2995-2997.

Mauchline W.S. & Keevil C.W. (1991) Development of the BIOLOG substrate utilization system for identification of *Legionella spp.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(11), 3345-3349.

McDade J.E., Shepard C.C., Fraser D.W., Tsai T.R., Redus M.A. & Dowdle W.R. (1977) Legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease, *N. Engl. J. Med.*, **297**(22),1197-1203.

McKillip J.L., Jaykus L.A. & Drake M. (1998) rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(11), 4264-4268.

Meenhorst P.L., Reingold A.L., Gorman G.W., Feeley J.C., Van Cronenburg B.J., Meyer C.L. & Van Furth R. (1983) *Legionella* pneumonia in guinea pigs exposed to aerosols of concentrated potable water from a hospital with nosocomial Legionnaires' disease, *J. Infect. Dis.*, **147**(1), 129-132.

Mehta S.K., Robinson D.M., Groves T.O., Stetzenbach L.D. & Pierson D.L. (2000) Evaluation of portable air samplers for monitoring airborne culturable bacteria, *A. I. H. A. J.*, **61**, 850-854.

Miyake M., Watanabe T., Koike H., Molmeret M., Imai Y. & Abu Kwaik Y. (2005) Characterization of *Legionella pneumophila pmiA*, a gene essential for infectivity of protozoa and macrophages, *Infect. Immun.*, **73**(10), 6272-6282.

Miyamoto H., Yamamoto H., Arima K., Fujii J., Maruta K., Izu K., Shiomori T. & Yoshida S. (1997) Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *legionellae* in hospital cooling tower water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(7), 2489-2494.

Miller L.A., Beebe J.L., Butler J.C., Martin W., Benson R., Hoffman R.E. & Fields B.S. (1993) Use of polymerase chain reaction in an epidemiologic investigation of Pontiac fever, *J. Infect. Dis.*, **168**(3), 769-772.

Mody C.H., Paine R., Shahrabadi M.S., Simon R.H., Pearlman E., Eisenstein B.I. & Toews G.B. (1993) *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells, *J. Infect. Dis.*, **167**(5), 1138-1145.

Molmeret M., Horn M., Wagner M., Santic M. & Abu Kwaik Y. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(1), 20-28.

Molmeret M., Bitar D.M., Han L. & Abu Kwaik Y. (2004) Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*, *Microbes and Infection*, **6**, 129-139.

Molofski A.B., Shetron-Rama L.M. & Swanson M.S. (2005) Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death, *Infect. Immun.*, **73**(9), 5720-5734.

Molofski A.B. & Swanson M.S. (2004) Differentiate to thrive : lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle, *Molecular Microbiol.*, **53**(1), 29-40.

Montanaro-Punzengruber J.C., Hicks L., Meyer W. & Gilbert G.L. (1999) Australian isolates of *Legionella longbeachae* are not a clonal population, *J. Clin. Microbiol.*, **37**(10), 3249-3254.

Morris G.K., Patton C.M., Feeley J.C., Johnson S.E., Gorman G., Martin W.T., Skaliy P., Mallison G.F., Politi B.D. & Mackel D.C. (1979) Isolation of the Legionnaires'disease bacterium from environmental samples, *Ann. Intern. Med.*, **90**, 664-666.

Moss C.W., Karr D.E. & Dees S.B. (1981) Cellular fatty acid composition of *Legionella longbeachae* sp. nov., *J. Clin. Microbiol.*, **14**(6), 692-694.

Moss C.W. & Dees S.B. (1979) Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires' disease bacteria, *J. Clin. Microbiol.*, **9**(5), 648-649.

Moter A. & Göbel U.B. (2000) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms, *J. Microbiol. Meth.*, **41**, 85-112.

Muder R.R. & Yu V.L. (2002) Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*, *Clin. Infect. Dis.*, **35**(8), 990-998.

Muller D., Edwards M.L. & Smith D.W. (1983) Changes in iron and transferrin levels and body temperature in experimental airborne legionellosis, *J. Infect. Dis.*, **147**(2), 302-307.

Murga R., Forster T.S., Brown E., Pruckler J.M., Fields B.S. & Donlan R.M. (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system, *Microbiology*, **147**(Pt 11), 3121-3126.

Nahapetian K., Challemel O., Beurtin D., Dubrou S., Gounon P. & Squinazi F. (1991) The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems, *Res. Microbiol.*, **142**(6), 677-685.

Neidhardt F.C., Ingraham J.L. & Schaechter M. (1994) Physiologie de la cellule bactérienne, une approche moléculaire, Editions Masson, Paris, 487pp.

Nesa D., Lortholary J., Bouakline A., Bordes M., Chandenier J., Derouin F. & Gangneux J.P. (2001) Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination, *J. Hosp. Infect.*, **47**(2), 149-155.

Neumeister B., Schöniger S., Faigle M., Eichner M. & Dietz K. (1997) Multiplication of different *Legionella* species in mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(4), 1219-1224.

Newsome A.L., Scott T.M., Benson R.F. & Fields B.S. (1998) Isolation of an Amoeba naturally harboring a distintive *Legionella species*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(5), 1688-1693.

Nhu Nguyen T.M., Ilef D., Jarraud S., Rouil L., Campese C., Che D., Haeghebaert S., Ganiayre F., Marcel F., Etienne J. & Desenclos J.C. (2006) A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers – how far can contaminated aerosols spread?, *J. I. D.*, **193**, 102-111.

Nolte F.S. & Conlin C.A. (1986) Major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* carries a species-specific epitope, *J. Clin. Microbiol.*, **23**(3), 643-646.

Nowicki M., Paucod J.C., Bornstein N., Isoard P. & Fleurette J. (1988) Efficacy of spiramycin on experimental airborne legionellosis in guinea pigs, *J. Antimicrob. Chem.*, **22**(supl B), 63-68.

Nyström T. (2001) Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and deat, *Arch. Microbiol.*, **176**(3), 159-164.

OPQR

Oguma K., Katayama H. & Ohgaki S. (2004) Potoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp, *Water Res.*, 2757-2763.

Ohno A., Kato N., Yamada K. & Yamaguchi K. (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(5), 2540-2547.

Organisation Mondiale de la Santé (2000) Legionnaires' disease, Europe, 1999, *Wkly Epidemiol. Rec.*, **75**(43), 345-352.

Ortiz-Roque C.M. & Hazen T.C. (1987) Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(9), 2231-2236.

Otten S., Iyer S., Johnson W. & Montgomery R. (1986) Serospecific antigens of *Legionella pneumophila*, *J. Bacteriol.*, **167**(3), 893-904.

Paez-Rubio T., Viau E., Romero-Hernandez S. & Peccia J. (2005) Source bioaerosol concentration and rRNA gene-based identification of microorganisms aerosolized at a flood irrigation wastewater reuse site, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 804-810.

Palm P.E., McNerney J.M. & Hatch T. (1956) Respiratory dust retention in small animals ; a comparison with man, *AMA Arch. Ind. Health*, **13**(4), 355-365.

Palmer C.J., Tsai Y.L., Paszko-Kolva C., Mayer C. & Sangermano L.R. (1993) Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(11), 3618-3624.

Pascual L., Perez-Luz S., Amo A., Moreno C., Apraiz D. & Catalan V. (2001) Detection of *Legionella pneumophila* in bioaerosols by polymerase chain reaction, *Can. J. Microbiol.*, **47**, 341-347.

Perola O., Kauppinen J., Kusnetsov J., Kärkkäinen U.M., Lück P.C. & Katila M.L. (2005) Persistent *Legionella pneumophila* colonization of a hospital water supply: efficacy of control methods and a molecular epidemiological analysis, *A. P. M. I. S.*, **113**, 45-53.

Phe M.H., Dossot M., Guilloteau H. & 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**(15), 3618-3628.

Philip P., Taillard J., Moore N., Delord S., Valtat C., Sagaspe P. & Bioulac B. (2006) The effects of coffee and napping on nighttime highway driving: a randomized trial, *Ann. Intern. Med.*, **144**(11), 785-791.

Philippe C., Blech M.F. & Hartemann P. (2006) Multiplication intra-amibienne de *Legionella pneumophila* et rôle potentiel des amibes dans la transmission de la légionellose, *Med. Mal. Infect.*, **36**(4), 196-200.

Pillai S.D. & Ricke S.C. (2002) Bioaerosols from municipal and animal wastes: background and contemporary issues, *Can. J. Microbiol.*, **48**, 681-696.

Plouffe J.F., Webster L.R. & Hackman B. (1983) Relationship between colonization of hospital buildings with *Legionella pneumophila* and hot water temperatures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**(3), 769-770.

P.N.S.E. (Plan National Santé Environnement) (2004-2008) Franchir une nouvelle étape dans la prévention des risques sanitaires liés à l'environnement, *http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/pnse/rapport.pdf* (consulté en juin 2006), pp 92.

Poulsen L.K., Ballard G. & Stahl D.A. (1993) Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1354-1360.

Predicala B.Z., Urban J.E., Maghirang R.G., Jerez S.B. & Goodband R.D. (2002) Assessment of bioaerosols in swine barns by filtration and impaction, *Curr. Microbiol.*, **44**, 136-140.

P.R.S.E. (Plan Régional Santé Environnement) (2006) Prévention de la légionellose, *http://www.lorraine.drire.gouv.fr* (consulté en juin 2006), 13-20.

Ramos C., Molbak L. & Molin S. (2000) Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 801-809.

Reyrolle M., Ratat C., Leportier M., Jarraud S., Freney J. & Etienne J. (2004) Rapid identification of *Legionella pneumophila* serogroups by latex agglutination, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23,** 864-866.

Richardson I.R. (1990) The incidence of *Bdellovibrio spp.* in man-made water systems: coexistence with *legionellas*, *J. Appl. Bacteriol.*,**69**(1), 134-140.

Riffard S., Douglass S., Brooks T., Springthorpe S., Filion L.G. & Sattar S.A. (2001) Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study, *Water Sci. Technol.*, **43**(12), 99-102.

Riffard S., Vandenesch F., Reyrolle M. & Etienne J. (1996) Distribution of mip-related sequences in 39 species (48 serogroups) of *Legionellaceae*, *Epidemiol. Infect.*, **117**(3), 501-506.

Rodgers F.G. & Oldham L.J. (1984) Glycocalyx and ruthenium red labeling of *Legionella pneumophila*, *J. Clin. Microbiol.*, **20**(6), 1228-1229.

Rodgers F.G., Greaves P.W., Macrae A.D. & Lewis M.J. (1980) Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*, *J. Clin. Pathol.*, **33**,1184-1188.

Rodgers F.G., Greaves P.W. & Macrae A.D. (1979) Flagella and fimbriae on *Legionella* organisms, *Lancet*, **2**(8145), 753-754.

Rodgers F.G., Macrae A.D. & Lewis M.J. (1978) Electron microscopy of the organism of Legionnaires' disease, *Nature*, **272**, 825-826.

Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V. & Keevil C.W. (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(5), 1585-1592.

Rogers J. & Keevil C.W. (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(7), 2326-2330.

Rowbotham T.J. (1984) *Legionellae* and Amoebae p 325-327 *In* Thornsberry C., Balows A., Feeley J.C. & Jakubowski W. (ed.), *Legionella* : Proceedings of the 2nd International Symposium, Atlanta, Georgia. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Rowbotham T.J. (1983) Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens *via* amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae, *J. Clin. Pathol.*, **36**, 978-986.

Rowbotham T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenecity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *J. Clin. Pathol.*, **33**, 1179-1183.

Ruf B., Schurmann D., Horbach I., Fehrenbach F.J. & Pohle H.D. (1990) Prevalence and diagnosis of *Legionella* pneumonia: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection, *J. Infect. Dis.*, **162**(6), 1341-1348.

ST

Saby S., Sibille I., Mathieu L., Paquin J.L. & Block J.C. (1997) Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(4), 1564-1569.

Satoh W., Nakata M., Yamamoto H., Ezaki T. & Hiramatsu K. (2002) Enumeration of *Legionella* CFU by colony hybridization using specific DNA probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(12), 6466-6470.

Shah A., Check F., Baskin S., Reyman T. & Menard R. (1992) Legionnaires' disease and acute renal failure: case report and review, *Clin. Infect. Dis.*, **14**(1), 204-207.

Singh T. & Coogan M.M. (2005) Isolation of pathogenic *Legionella* species and legionella-laden amoebae in dental unit waterlines, *J. Hosp. Infect.*, **61**, 257-262.

Sire S., Staub T. & Christmann D. (1994) Manifestations extra-pulmonaires des légionelloses, *Méd. Mal. Infect.*, **24**, 874-880.

Smith-Somerville H.E., Huryn V.B., Walker C. & Winters A.L. (1991) Survival of *Legionella pneumophila* in the cold-water ciliate *Tetrahymena vorax*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(9), 2742-2749.

Snelling W.J., Moore J.E., McKenna J.P., Lecky D.M. & Dooley J.S. (2006) Bacterial-protozoa interactions ; an update on the role these phenomena play towards human illness, *Microbes Infect.*, **8**(2), 578-587.

Södeberg M.A., Rossier O. & Cianciotto N.P. (2004) The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures, *J. Bacteriol.*, **186**(12), 3712-3720.

Spitalny K.C., Vogt R.L., Orciari L.A., Witherell L.E., Etkind P. & Novick L.F. (1984) Pontiac fever associated with a whirlpool spa, *Am. J. Epidemiol.*, **120**(6), 809-817.

Standards Australia (1998) Waters examination for *legionellae* including *Legionella pneumophila*, Standars Australia, Sydney, Australia.

States S.J., Conley L.F., Ceraso M., Stephenson T.E., Wolford R.S., Wadowsky R.M., McNamara A.M. & Yee R.B. (1987) Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**(5), 1149-1154.

Steele T., Lanser J. & Sangster N. (1990a) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(1), 49-53.

Steele T., Moore C.V. & Sangster N. (1990b) Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *Legionellae* in potting soils in Australia, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(10), 2984-2988.

Steinert M., Hentschel U. & Hacker J. (2002) *Legionella pneumophila* : an aquatic microbe goes astray, *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**,149-162.

Steinert M., Emödy L., Amann R. & Hacker J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(5), 2047-2053.

Stewart S.L., Grinshpun S.A., Willeke K., Terzieva S., Ulevicius V. & Donnelly J. (1995) Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1232-1239.

Stone B.J. & Abu Kwaik Y. (1999) Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili, *J. Bacteriol.*, **181**(5), 1395-1402.

Stone B.J. & Abu Kwaik Y. (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells, *Infect. Immun.*, **66**(4), 1768-1775.

Storch G., Hayes P.S., Hill D.L. & Baine W.B. (1979) Prevalence of antibody to *Legionella pneumophila* in middle-aged and elderly Americans, *J. Infect. Dis.*, **140**(5), 784-788.

Stout J.E. & Yu V.L. (1997) Legionellosis, *N. Engl. J. Med.*, **337**(10), 682-687.

Stout J.E., Yu V.L., Murcana P., Joly J, Troup N. & Tompkins L.S. (1992) Potable water as a cause of sporadic cases of community-acquired Legionnaires' disease, *N. Engl. J. Med.*, **326**(3), 151-155.

Stout J.E., Best M.G. & Yu V.L. (1986) Susceptibility of members of the family *Legionellaceae* to thermal stress : implications for heat eradication methods in water distribution systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**(2), 396-399.

Stout J.E., Yu V.L. & Best M.G. (1985) Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(1), 221-228.

Ta A.C., Stout J., Yu V.L. & Wagener M.N. (1995) Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospitals potable water systems and recommendantions for standardization of such methods, *J. Clin. Microbiol.*, **33**(8), 2118-2123.

Tang P.W., Toma S. & McMillan L.G. (1989) *Legionella oakdrigensis* : laboratory diagnosis of a human infection, *J. Clin. Microbiol.*, **21**(3), 462-463.

Tang P.W., Toma S. & MacMillan L.G. (1985) *Legionella oakridgensis*: laboratory diagnosis of a human infection, *J. Clin. Microbiol.*, **21**(3), 462-463.

Tatlock H. (1944) A rickettsia-like organism recovered from guinea pigs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 95-99.

Terzieva S., Donnelly J., Ulevicius V., Grinshpun S.A., Willeke K., Stelma G.N. & Brenner K.P. (1996) Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2264-2272.

Thacker S.B., Bennett J.V., Tsai T.F., Fraser D.W., McDade J.E., Shepard C.C., Williams K.H. Jr, Stuart W.H., Dull H.B. & Eickhoff T.C. (1978) An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium, *J. Infect. Dis.*, **138**(4), 512-519.

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, *J. Appl Microbiol.*, **97**(5), 950-963.

Thomas D.L., Mundy L.M. & Tucker P.C. (1993) Hot tub legionellosis. Legionnaires' disease and Pontiac fever after a point-source exposure to *Legionella pneumophila*, *Arch. Intern. Med.*, **153**(22), 2597-2599.

Thomason B.M., Chandler F.W. & Hollis D.G. (1979) Flagella on Legionnaires' disease bacteria: an interim report, *Ann. Intern. Med.*, **91**(2), 224-226.

Tison D.L., Barros J.A. & Seidler R.J. (1983) *Legionella* in aquatic habitats in the Mount Saint Helens blast zone, *Curr. Microbiol.*, **9**, 345-348.

Tison D.L., Pope D.H., Cherry W.B. & Fliermans C.B. (1980) Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (Cyanobacteria), *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**(2), 456-459.

Tomov A., Kassovsky V., Chorbadjiiska L., Tsvetkova E., Tsanev N. & Vencheva Z. (1982) Lytic activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* against bacteria of the family *Legionellaceae*, *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, **252**(1), 96-100.

Tossa P., Deloge-Abarkan M., Zmirou-Navier D., Hartemann P. & Mathieu L. (2006) Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies, *BMC Public Health*, 6(1), 112.

Toze S., Sly L.I., MacRae I.C. & Fuerst J.A. (1990) Inhibition of growth of *Legionella* species by heterotrophic plate count bacteria isolated from chlorinated drinking water, *Curr. Microbiol.*, **21**(2), 139-143.

Tsai T.F., Finn D.R., Plikaytis B.D., McCauley W., Martin S.M. & Fraser D.W. (1979) Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia, *Ann. Intern. Med.*, **90**(4), 509-517.

Tully M. (1991) A plasmid from a virulent strain of *Legionella pneumophila* is conjugative and confers resistance to ultraviolet light, *FEMS Microbiol. Lett.*, **90**(1), 43-48.

Turetgen I., Sungur E.I. & Cotuk A. (2005) Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems, *Environ. Monit. Assess.*, **100**(1-3), 53-58.

Twisk-Meijssen M.J., Meenhorst P.L., van Cronenburg B.J., Mulder J.D., Scheffer E. & Van Furth R. (1987) The course of *Legionella* pneumonia in guinea pigs after inhalation of various quantities of *L. pneumophila*, *Immunobiology*, **176**(1-2), 108-124.

Tyndall R.L., Hand R.E., Mann R.C., Evans C. & Jernigan R. (1985) Application of flow cytometry to detection and characterization of *Legionella spp.*, *Appl Environ Microbiol*, **44**, 4, 954-9.

UVW

Ulevicius V., Willeke K., Grinshpun S.A., Donnelly L., Lin X. & Mainelis G. (1997) Aerosolization of particles from a bubbling particles, *Aerosol Sci. Technol.*, **26**, 175-190.

Van der Kooij D., Veenendaal H.R. & Scheffer W.J. (2005) Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene, *Water Res.*, **39**(13), 2789-2798.

Vickers R.M., Yu V.L., Hanna S.S., Muraca P., Diven W., Carmen N. & Taylor F.B. (1987) Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study, *Infect. Control*, **8**(9), 357-363.

Villarino A, Bouvet O., Regnault B., Delautre S. & Grimont P.A. (2000) Cellular activities in ultra-violet killed *Escherichia coli*, *Int. J. Food Microbiol.*, **55**(1-3), 245-247.

Visca P., Goldoni P., Lück P.C., Helbig J.H., Cattani L., Giltri G., Bramati S. & Castellani Pastoris M. (1999) Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections, *J. Clin. Microbiol.*, **37**(7), 2189-2196.

Viswanathan V.K., Edelstein P.H., Pope C.D. & Cianciotto N.P. (2000) The *Legionella pneumophila iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence, *Infect. Immun.*, **68**(3), 1069-1079.

Voysey P.A. & Brown M. (2000) Microbiological risk assessment : a new aproach to food safety control, *Int. J. Food Microbiol.*, **58**, 173-179.

Wadowsky R.M., Wolford R., McNamara A.M. & Yee R.B. (1985) Effet of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(5), 1197-1205.

Wadowsky R.M. & Yee R.B. (1985) Effet of non *Legionellacae* bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(5), 1206-1210.

Wadowsky R.M. & Yee R.B. (1983) Satellite growth of *Legionella pneumophila* environmental isolate of *Flavobacterium breve*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**(6), 1447-1449.

Wadowsky R.M., Yee R.B., Mezmar L., Wing E.J. & Dowling J.N. (1982) Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**(5), 1104-1110.

Walker J.T., Bradshaw D.J., Bennett A.M., Fulford M.R., Martin M.V. & Marsh P.D. (2000) Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(8), 3363-3367.

Wallis L. & Robinson P. (2005) Soil as a source of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1), *Aust. N. Z. J. Public Health,* **29**(6) 518-520.

Wang Z., Reponen T., Grinshpun S.A., Gorny R.L. & Willeke K. (2001) Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection, *J. Aerosol Sci.*, **32**, 661-674.

Watts J.C., Hicklin M.D., Thomason B.M., Callaway C.S. & Levine A.J. (1980) Fatal pneumonia caused by *Legionella pneumophila*, serogroup 3: demonstration of the bacilli in extrathoracic organs, *Ann. Intern. Med.,* **92**(Pt1), 186-188.

Webb S.J. (1959) Factors affecting the viability of airborne bacteria, I. Bacteria aerosolized from distilled water, *Can. J. Microbiol.*, **5**, 649-669.

Wellinghausen N., Frost C. & Marre R. (2001) Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(9),3985-3993.

White L.A., Hadley D.J., Davids D.E. & Naylor R. (1975) Improved large-volume sampler for the collection of bacterial cells from Aerosol, *Appl. Microbiol.*, **29**, 335-339.

Williams M.M. & Braun-Howland E.B. (2003) Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(9), 5463-5471.

Winn W.C. (1988) Legionnaires disease : historical perspective, *Clin. Microbiol.*, **1**(1), 60-61.

Winn W.C., Davis G.S., Gump D.W., Craighead J.E. & Beaty H.N. (1982) Legionnaires' pneumonia after intratracheal inoculation of guinea pigs and rats, *Lab. Invest.*, **47**(6), 568-578.

Woese C.R. (1987) Bacterial evolution, *Microbiol Rev.,* **51**(2), 221-271.

Woo A.H., Yu V.L. & Goetz A. (1986) Potential in-hospital modes of transmission of *Legionella pneumophila*. Demonstration experiments for dissemination by showers, humidifiers and rinsing of ventilation bag apparatus, *Am. J. Med.*, **80**, 567-573.

Wullings B.A. & Van der Kooij D. (2006) Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella spp.* in drinking water treated at temperatures below 15°C, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(1), 157-166.

Wullings B., Voogt R., Veenendaal H. & Van der Kooij D. (2002) The fluorescent *in situ* hybridization test in comparison with culture for detection of *Legionella pneumophila* in water samples, p. 263-266. *In* R. Marre, Y. Abu Kwaik, C. Bartlett, N. P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker, and P. C. Lück (ed.), *Legionella*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.

XYZ

Xu L.Z. (1993) La « nested PCR » (nPCR), *In* La PCR, un procédé de réplication *in vitro*, Larzul D. (ed.), Lavoisier, p. 39-44.

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. & Chereshsky A. (2000) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey, *J. Infect. Dis.*, **186**(1), 127-128.

Zacheus O.M. & Martikainen P.J. (1994) Occurrence of legionellae in hot water distribution systems of Finnish apartment buildings, *Can. J. Microbiol.*, **40**(12), 993-999.

Zhou J., Davey M.E., Figueras J.B., Rivkina E., Gilichinsky D. & Tiedje J.M. (1997) Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA, *Microbiology*, **143**, 3913-3919.

Zmirou-Navier D., Gofti-Laroche L. & Hartemann P. (2006) Waterborne microbial risk assessment: a population-based dose-response function for *Giardia spp.* (E.MI.R.A study), *BMC Public Health*, **6**(122).

Zuravleff J.J., Yu V.L., Shonnard J.W., Rihis J.D. & Best M. (1983) *Legionella pneumophila* contamination of a hospital humidifier. Demonstration of aerosol transmission and subsequent subclinical infection in exposed guinea pigs, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128**(4), 657-661.

ANNEXES

A_1

REGISTRES DE RECUEIL

Tableau A1.1 : Registre de recueil des informations générales et antécédents médicaux des personnes âgées.

Nom et adresse de l'établissement *(ou cachet)*	

NOM de la (ou des) personne(s) ayant rempli ce feuillet : .....

ACTIVITE au sein de l'établissement : .....

PROJET LEGION'AIR

		Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code
Age											
Sexe		M F	M F	M F	M F	M F	M F	M F	M F	M F	M F
Date d'entrée dans l'établissement		..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... / .....
Date de sortie de l'établissement (définitive)		..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... /	..... / ..... / .....
Chambre N°											
Etage											
Service											
TABAGISME	Tabagisme actuel	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non
	Ancienneté (an)										
	Nb cigarettes/jour										
	Ancien fumeur	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non	Oui Non
	Ancienneté (an)										
	Nb cigarettes/jour										
Pathologies RESPIRATOIRES pré-existantes											
Maladies Affectant l'Etat IMMUNITAIRE											

Tableau A1.2 : Registre de recueil des signes cliniques quotidiens au cours des quatre mois de suivi des personnes âgées.

Semaine du ..... /..... / 200... au ..... /..... / 200...

PROJET LEGION'AIR

Symptômes NOUVEAUX observés (pyrexie et associés)	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code	Code
	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D
T°C (> 38 °C)												
Toux Sèche (S) ou Grasse (G)												
Myalgies												
Céphalées												
Frissons												
Diarrhée												
Vomissements												
Vertiges												
Asthénie												
Autre (à préciser)												
Epidémie intercurrente												
Traitement immunodépresseur (O / N)												
Traitement Antibiotique (O / N)												
TOILETTE — Toilette effectuée (nombre de fois) Lit (L) ou Lavabo (L) Bain (B) et Douche (D)	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D
TOILETTE — Le bain (B) ou douche (D) concerne N° salle												
TOILETTE — Volume de l'espace douche (m³)												
TOILETTE — Heure de Prise												
TOILETTE — Fonctions : tenu à la main (M), fixe (F) ou les deux (D)												
SORTIES — Remplir les jours d'absence. Hospitalisation (H) Famille (F) Vacances (V) autre (préciser)												
SORTIES — Lieu												
SORTIES — Prise de douche (O / N)												

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Nancy-Université

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Prénom, Nom : **Magali DELOGE-ABARKAN**

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en **Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER N° 1246

Nancy, le 9 octobre 2006

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY 1 LE PRÉSIDENT

Jean-Pierre FINANCE

RESUME

La gestion du risque lié à *Legionella* est une préoccupation importante des autorités sanitaires et la réduction d risque est inscrite au rang des priorités dans la loi relative à la politique de santé publique de 2004. Cette bactérie être responsable de deux pathologies : la fièvre de Pontiac et la maladie du Légionnaire. Les habitats aquatiques so réservoir naturel de *Legionella* et malgré une réglementation de plus en plus contraignante concernant sa présence l'eau, le risque demeure d'actualité. L'aérosol est la voie de contamination de la bactérie, mais il n'est pas encore en considération dans la gestion de ce risque bactérien. Pourtant, l'urbanisation et les progrès technologiques ont do à cette bactérie la possibilité de se développer dans des installations hydriques artificielles (tours aéroréfrigéran réseaux d'eau chaude, systèmes de climatisation) et d'être diffusée sous forme d'aérosols, puis inhalée. Or, à ce jou n'existe pas de relation connue entre la teneur en légionelles dans l'eau et celle dans l'aérosol, ni de relation dose-e sur l'Homme établie.

Dans ce contexte, ce travail de recherche concerne l'exposition à la bactérie *Legionella* présente dans des aéro d'eaux chaudes contaminées, et vise à quantifier le risque d'infection à cette bactérie dans une population sensible s'intéresse à la forme bénigne de l'infection à *Legionella*, la fièvre de Pontiac. Le modèle d'exposition choisi est c de personnes âgées vivant en maisons de retraite dans la région Lorraine ; et la voie d'exposition est l'aérosol généré l de la prise de douche. Cette recherche associe des aspects de biologie environnementale à des aspe épidémiologiques. Elle met en œuvre des outils innovants de caractérisation des expositions, à la fois en termes collecte d'aérosol et de mesure des légionelles aérosolisées. L'exposition des 828 personnes âgées volontaires a été pr en compte à la fois à partir de données écologiques (concentrations de *Legionella* dans l'eau et dans l'air) et caractéristiques individuelles (fréquence de la prise de douche, âge, sexe, tabagisme, antécédents médicaux, recueillie quotidiennement au cours d'un suivi de quatre mois dans chacune des 34 maisons de retraite volontaires d région lorraine.

L'analyse de l'occurrence de *Legionella* dans les eaux chaudes de douches a montré que seulement un cinquième maisons de retraite présentait des *Legionella* cultivables (UFC) et plus de la moitié des *Legionella* hybridées (méth FISH). A partir d'une grille d'analyse des points critiques, le diagnostic réseau a permis de déterminer des scores criticité de risque de présence de *Legionella* dans les réseaux d'eau. Ainsi, il s'est avéré que cette grille d'analyse ba sur le diagnostic réseau est pertinente pour prédire le risque de présence de *Legionella* cultivables. En eff l'observation de facteurs de risque sur le réseau de distribution d'eau chaude et les points d'usage augmente le risque présence de légionelles dans les eaux chaudes.

La collecte de bioaérosols a été réalisée aux mêmes points de douche et a montré, par impaction en milieu liquide, q 29% des échantillons contenaient *Legionella* aéroportée (méthode FISH) alors qu'aucune *Legionella* aéropor cultivable n'a été détectée. Pour tous les prélèvements d'aérosols positifs en *Legionella*, cette bactérie a été au détectée dans les eaux chaudes du même point de douche avec un risque 6,8 fois plus élevé (I.C. à 95% = 2,6 - 47,1) détecter *Legionella* dans l'aérosol quand la concentration dans l'eau chaude est supérieure à 10^5 *Legionella*-FISH.L^{-1}.

Un des points forts de ce travail a été de proposer, à partir de l'étude épidémiologique sur les personnes âgées, u définition opérationnelle de la fièvre de Pontiac. Ceci nous a permis de diagnostiquer 30 cas de fièvre de Ponti développés par 29 personnes âgées, de 16 maisons de retraite, correspondant à une densité d'incidence de 0, cas/personne.an (I.C. à 95% : 0,07-0,15). L'analyse des antécédents de santé et des caractéristiques des cas a mont que seules la présence de troubles cognitifs et la prise de corticothérapie (O.R. = 4,0 ; I.C. à 95% : 1,1 - 14,9) sont d facteurs associés à la fièvre de Pontiac ainsi que les niveaux d'exposition à *Legionella*, définis selon plusieu hypothèses d'exposition :

- $\geq 10^4$ *Legionella*-UFC.L^{-1} eau : facteur de risque de 2,5 (I.C. à 95% : 0,9 - 7,4) ;
- $\geq 10^5$ *Legionella*-FISH.L^{-1} eau : facteur de risque de 2,3 (I.C. à 95% : 1,1 - 5,1), avec une relation dos effet mise en évidence entre les concentrations de *Legionella* mesurées par FISH dans l'eau et la probabilité survenue de la fièvre de Pontiac.
- $\geq 10^3$ *Legionella*-FISH.L^{-1} air : facteur de risque de 1,6 (I.C. à 95% : 0,8 - 3,5).

En ne considérant que les cas exposés à des aérosols contaminés par au minimum 10^3 *Legionella*-FISH.L^{-1} air, le risq de développer une fièvre de Pontiac est supérieur à 30 ; facteur de risque plus élevé que celui obtenu pour d concentrations dans l'eau chaude avec la même technique, FISH (O.R. = 2,3 ; I.C. à 95% : 1,1 - 5,1).

Au regard de nos résultats, le seuil fixé par la réglementation française, 10^3 *Legionella*-UFC.L^{-1} eau, semble protecte pour la population générale face au risque épidémique de fièvre de Pontiac et constitue même une réelle marge sécurité à d'éventuelles maladies du Légionnaire. De plus, la voie d'exposition -aérosol-, qui pèse le plus sur le risq de fièvre de Pontiac, doit donc être privilégier dans des travaux ultérieurs sur le risque de fièvre de Pontiac ou tout aut infection liée à *Legionella*.

Mots clés : *Legionella*, eau, aérosol, fièvre de Pontiac, personnes âgées, maison de retraite, douches, facteurs de risqu exposition.