

LEGIOAEROPATHO : Impact de facteurs environnementaux sur la survie et la pathogénicité des légionelles aérosolisées

Florence Ader¹, Jacques Frère^{2*}, Christophe Froment³, Thi Lan Ha³, Sophie Jarraud¹, Mohamad Koubar², Laurence Mathieu⁴, Christelle Ollivier³, Bernard Parinet¹, Enric Robine³, Marie-Hélène Rodier², Julien Simonet⁴

¹ CNR des légionelles, INSERM U851, Université Lyon 1, 7 rue Guillaume Paradin, 69 372 Lyon Cedex 08

² UMR 6008 CNRS, Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers, 40 av du recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex

³ Laboratoire Recherche et Innovation pour l'Hygiène du Bâtiment (RIHB), Centre Scientifique et Technique du Bâtiment, 84 avenue Jean Jaurès 77 447 Marne La Vallée cedex 2

⁴ EPHE, UMR 7564 CNRS, LCPME, 15 av. du Charmois 54500 Vandoeuvre les Nancy

*coordinateur : Jacques Frère, (33) 549 45 4013, jacques.frere@univ-poitiers.fr

Résumé

Legionella pneumophila est l'agent responsable de la légionellose, une infection respiratoire dont la mortalité est d'environ 15%. La recrudescence récente des épisodes communautaires positionne cette maladie comme un objectif prioritaire de santé publique. Les légionelles sont des bactéries à tropisme hydrique. Elles affectionnent particulièrement les eaux tièdes et colonisent, à la faveur de conditions favorables, les réseaux d'eau chaude sanitaire et les circuits associés aux tours aéroréfrigérantes. Dans l'environnement, les amibes semblent jouer un rôle central dans la multiplication de ces bactéries. Une fois ingérées par l'amibe, les légionelles s'y multiplient avant d'être relarguées dans le milieu extracellulaire. La transmission à l'Homme se fait par l'intermédiaire d'aérosols contaminés. Le programme LEGIOAEROPATHO avait pour objectif d'étudier le rôle et l'influence de l'environnement sur la survie, la cytotoxicité et l'interaction de *L. pneumophila* avec l'hôte. Nous avons abordé l'influence de facteurs physicochimiques et biologiques sur la survie de *L. pneumophila* dans le compartiment hydrique et aérien. Nous avons ainsi étudié l'effet de la présence de matières organiques (extraites d'eau de surface) et minérales (eau distillée *versus* eau d'Evian) et du passage dans les amibes (*Acanthamoeba castellanii*) sur la viabilité des légionelles et leur persistance dans l'aérosol.

Nos résultats montrent l'importance de la présence de matières minérales dans la survie des légionelles dans l'eau et les aérosols. Une réplication dans les amibes améliore également la survie de ces bactéries dans les aérosols.

Un dispositif de production d'aérosols contrôlés a été mis au point pour permettre l'exposition d'un modèle murin à des aérosols contaminés avec *L. pneumophila* souche Lens. Nous avons observé que les doses de légionelles délivrées dans les aérosols, plus faibles que celles délivrées par instillation intranasale, sont suffisantes pour infecter les animaux exposés. La multiplication plus importante dans les poumons des bactéries apportées par les aérosols semble montrer que cette voie de contamination est plus propice à l'implantation pulmonaire des légionelles que l'instillation intranasale. Le passage dans les amibes semble conduire à une plus grande efficacité dans cette implantation pulmonaire, ainsi que dans la prolifération sur cultures cellulaires (pneumocytes et macrophages humains).

Nous observons donc un rôle prépondérant de la réplication des légionelles dans les amibes pour leur survie dans les aérosols et leur infectiosité.

Ces observations nous conduisent à proposer pour une meilleure gestion du risque légionelles, de mieux prendre en compte l'écologie des légionelles dans l'eau (cf états physiologiques associés à la présence d'une charge minérale et la présence des amibes) dans le suivi de la qualité des eaux des installations à risque. Enfin, l'impact accru de la voie « aérosol » sur l'infection que nous mesurons, suggère que cette voie d'exposition doit être davantage intégrée dans l'évaluation du risque sanitaire lié aux légionelles.

Introduction

L. pneumophila, et particulièrement le sérotype 1, est l'agent responsable de la légionellose, une infection respiratoire dont la mortalité est d'environ 15 %. Plus de mille cas sont déclarés chaque année en France. Cette maladie sévit soit sous forme de cas sporadiques, soit sous forme d'épidémies hospitalières ou communautaires. La recrudescence récente des épisodes communautaires positionne cette maladie et ce pathogène singulier comme un objectif prioritaire de santé publique.

Bactéries à tropisme hydrique, les légionelles affectionnent particulièrement les eaux tièdes et colonisent, à la faveur de conditions favorables, les réseaux d'eau chaude sanitaire et circuits associés aux tours aéroréfrigérantes [1]. Leur survie dans l'environnement hydrique est souvent associée au parasitisme de certains protozoaires de type amibes qui sont reconnues pour leur rôle prépondérant dans la multiplication et la virulence des légionelles [2].

Legionella est transmise directement de l'environnement à l'homme via l'inhalation d'aérosols issus de réservoirs hydriques infectés [3]. Il n'y a pas de transmission interhumaine et aucun réservoir animal n'est rapporté [4]. Le caractère infectieux des agents microbiologiques aéroportés est lié à leur résistance sous forme d'aérosol, le passage du microorganisme du réservoir hydrique au compartiment aérien et l'exposition aux facteurs environnementaux (humidité et température, polluants de l'air, rayonnements) étant les deux stress majeurs de l'aérosolisation. Les données relatives à la persistance des *Legionella* aéroportées, sont à ce jour peu nombreuses. Elles indiquent l'influence du milieu réservoir et de sa composition, de la nature et l'état métabolique des légionelles dans le devenir de la bactérie [5-7]. De plus, les légionelles existent dans le compartiment aqueux sous d'autres formes que planctoniques. Il s'agit notamment des formes intra amibiennes susceptibles d'être aérosolisées et de favoriser la survie de la bactérie dans l'air.

Dans le tractus respiratoire de l'homme, *Legionella* est phagocyté par les macrophages et à un moindre degré par les cellules épithéliales. Chez les sujets susceptibles, l'exploitation à son profit des voies de trafficking intracellulaire (de façon similaire que dans les amibes) permet la multiplication bactérienne en échappant aux mécanismes de clairance du système immunitaire inné. Les résultats d'études expérimentales animales indiquent que la genèse d'une agression pulmonaire par *Legionella* est subordonnée à la capacité à infecter les cellules cibles pour s'y multiplier comme premier déterminant de la virulence [8,9].

Matériel et méthodes

Souches et conditions de culture

Un isolat clinique de la souche *L. pneumophila* Lens, la souche CIP 108 286, a été fourni par le CNRL aux partenaires. Une méthode de conservation et de propagation a été arrêtée par le consortium. La souche est cultivée sur gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract), ou selon les besoins, sur bouillon BYE (Buffered Yeast Extract), à 37 °C.

Pour la préparation d'une suspension de légionelles non filamenteuses, le protocole suivant a été appliqué :

Une culture dense sur gélose est réalisée. Après croissance à 37°C pendant 48h, la boîte est inondée par 10 ml d'eau stérile et la suspension dense est collectée. 9 ml de cette suspension servent à inoculer 91 ml de BYE dilué au 1/10. La culture est maintenue à 37°C pendant 12h avant la collecte des cellules. Les bactéries sont alors lavées deux fois par centrifugation avec de l'eau ultra-pure autoclavé. Les culots bactériens sont resuspendus dans les différents types d'eaux testées.

Acanthamoeba castellanii ATCC 50739 est cultivée en milieu PYG [13] pendant 3 jours à température ambiante en flasques de 75 cm². Les amibes sont ensuite placées en Tampon amibe (0.1 M KCl, 8 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 1 mM-NaHCO₃, 0.02 M Tris).

Les pneumocytes II (A549) et les monocytes (U937) sont cultivés dans des flasques de 75cm² en milieu RPMI- sérum de veau fœtal 10% (Gibco-BRL) à 37°C sous 5% de CO₂. La trypsine (trypsine 0,05%-EDTA, Gibco-BRL) est utilisée pour décrocher les pneumocytes. 50ng/mL de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) sont ajoutés 48 heures avant l'infection pour induire la différenciation des monocytes en macrophages adhérents.

Infection des cellules par *Legionella*

5 10⁵ cellules (amibes, pneumocytes ou macrophages) sont placées dans chaque puits d'une microplaque 12 puits et les légionelles sont ajoutées pour obtenir une MOI (multiplicité d'infection) de 1.

Les plaques sont ensuite centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante puis placées à 37°C pendant 55 minutes. Les surnageants sont alors remplacés par du RPMI-SVF10% pour les pneumocytes et les macrophages ou du Tampon amibes pour les amibes après un lavage des cellules par le même milieu.

Coloration des cellules à l'aide du kit Live/Dead BacLight Viability

Le Kit Live/Dead BacLight Viability (Molecular Probes) contient un mélange de composés colorant les acides nucléiques. Ces colorants diffèrent au niveau de leurs caractéristiques spectrales et de leur capacité à pénétrer dans les membranes cellulaires. Les bactéries possédant des membranes cellulaires intactes se colorent en vert fluorescent alors que celles qui présentent des membranes endommagées sont rouge fluorescent. Brièvement, la suspension bactérienne est colorée selon les préconisations du fournisseur, puis filtrée sur membrane PVDF 0,22 µm (millipore). Le filtre est ensuite placé sur une lame de verre. Une lamelle de verre est placée sur le filtre, le montage est fermé avec de la paraffine. Le dénombrement est effectué à l'aide d'un microscope Olympus B41 équipé en épifluorescence et d'une caméra CCD accompagné de sa station de traitement d'images.

Préparation de la Matière Organique Dissoute (MOD)

La MOD peut être fractionnée en trois parties, les HPO (hydrophobiques), les THP (transphiliques) et les HPI (hydrophiliques).

La fraction MOD retenue pour notre étude est la HPO, car elle correspond à la partie la plus représentative de la fraction non entropique de la MOD.

L'extraction consiste à faire percoler un échantillon préalablement filtré (0,8 µm), acidifié à pH = 2 à l'acide chlorhydrique, sur deux colonnes de 250 mL de résines XAD 8 et XAD 4 en série, à un débit de 3 L/h. L'élution des HPO

est réalisée en utilisant un mélange acétonitrile/eau (75:25 ; v:v). L'extrait est lyophilisé et stocké à 4 °C, à l'abri de la lumière. La détermination de la quantité de carbone organique total (COT) a été réalisée à l'aide d'un automate COT (TOC-5000A, Shimadzu).

Génération de l'aérosol de légionelles

L'aérosol de légionelles est produit à l'aide d'un montage d'aérobiocontamination confiné dans une boîte à gants [10]. Le mode de génération mis en œuvre consiste en une dispersion par voie humide, à l'aide d'un atomiseur brise-jet dans lequel sont introduites les suspensions bactériennes préalablement calibrées et préparées selon les modalités décrites dans le volet 2. L'aérosol de légionelles formé est monodisperse et se situe dans la fraction des particules microniques. Il est ensuite homogénéisé avec de l'air sec et filtré, à 30% d'hygrométrie et 20°C, puis collecté à l'aide d'un impacteur liquide (Impinger SKC ; milieu de collecte : eau ; débit de collecte 12.5 L/min.). L'échantillon collecté est analysé pour quantifier la flore de légionelles aérosolisées encore viable et cultivable.

Etude de l'infectiosité sur modèle murin

Deux voies d'administration ont été comparées : la voie intra-nasale (IN) de référence et l'aérosolisation (AE). Pour la voie IN, la dose délivrée était de 1×10^6 UFC/souris. Pour la voie AE, l'objectif a été d'approcher la dose inhalée de 1×10^6 UFC/souris sur la base de calculs intégrant les paramètres physiques de l'aérosol et le débit ventilatoire théorique d'une souris. Au final, le temps calculé d'exposition était de 10 minutes.

Sur les huit¹ lots de trois souris chacun testés dans le volet 3, quatre ont servi à la réalisation en parallèle des infections IN et AE. Ont été mesurés à T0 (sacrifice 3 h post-infection, temps pour l'inoculum d'atteindre le poumon profond) et 48 heures post-infection : (1) la charge bactérienne dans le poumon en culture sur BCYE et par biologie moléculaire (PCR quantitative) ; (2) la dissémination systémique dans le foie et la rate par méthode semi-quantitative ; le rapport des poids de poumon mouillé sur poids de poumon sec comme première approche d'index lésionnel pulmonaire. Les inocula bactériens en suspension et dans les aérosols ont été vérifiés par culture et analyse de la viabilité (BacLight).

Résultats et discussion

A - Présentation globale des expérimentations réalisées dans le programme

Le projet LEGIOAEROPATHO portait sur l'étude de la transmission de *L. pneumophila* sg1 souche Lens (Lp Lens), depuis le réservoir hydrique vers l'air, puis l'hôte. L'étude s'est organisée en 3 volets successifs et interdépendants.

1. Etude de l'écologie de *L. pneumophila* dans différents réservoirs hydriques

Le volet 1 visait à (1) maîtriser le matériel biologique et (2) évaluer l'effet de la présence de matières minérales et organiques (MO) sur la survie de Lp Lens dans l'eau, en cherchant à définir les conditions que nous mettrions en œuvre pour la production d'aérosols (2^{ème} volet).

De manière à avoir des caractéristiques constantes des eaux, accessibles à l'ensemble des équipes du consortium, deux modèles ont été choisis : (1) un de matières minérales : eau d'Evian ; (2) un de matières organiques dissoutes (MOD) naturelles extraites de l'eau de la Vienne². De même, il a été nécessaire d'optimiser un protocole de croissance en milieu liquide de la souche Lp Lens afin de standardiser le matériel biologique et le rendre compatible avec la génération d'aérosols. Le protocole mis en place a permis de recueillir des cellules en phase stationnaire de croissance d'une taille moyenne de 1,5 à 2 µm, précocement au stade de filamentation, et de réduire l'hétérogénéité du matériel qui rendait critique le contrôle de la production aéroportée.

Quatre qualités d'eau, préalablement stérilisées par filtration (0,2 µm) ont ainsi été inoculées par une suspension de Lp Lens à environ 10^8 cellules/mL : une eau distillée stérile et l'eau minérale stérile supplémentée ou non en MOD (ajout de 2 mg COT/L). La survie de Lp Lens dans ces quatre qualités d'eau a été quantifiée en fonction du temps, selon différentes méthodologies : dénombrement total des légionelles³, dénombrement des légionelles cultivables⁴, des légionelles présentant une membrane intègre⁵ et des légionelles hybridées⁶.

2. Etude de la persistance des Légionelles aérosolisées

Dans le volet 2, les objectifs étaient :

¹ Les quatre premiers lots ont été des lots tests avec des souris de réforme tel qu'exigé par le PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, ENS de Lyon).

² fraction hydrophobique HPO retenue sur résine XAD 8, retenue car représentative de la fraction non anthropique de la MOD.

³ Kit BacLight : comptage des cellules à fluorescence verte et rouge.

⁴ sur BCYE- α .

⁵ Kit BacLight : comptage des cellules à fluorescence verte uniquement.

⁶ méthodes d'hybridation in situ (FISH) avec la sonde Leg 705.

(1) de caractériser l'impact de la composition du réservoir hydrique (présence ou non de matières minérales et/ou organiques) sur la survie de Lp Lens lors de la phase d'aérosolisation (phase de transfert eau/air).

(2) d'évaluer l'impact de l'état physiologique de Lp Lens sur sa survie lors de l'aérosolisation. Nous avons défini les physiologies des légionelles en rapport avec leur capacité à cultiver et à conserver leur intégrité membranaire. Nous avons ainsi travaillé avec des suspensions de légionelles présentant a priori des physiologies différentes : (i) des suspensions vieilles 11 jours à 37°C dans les quatre qualités d'eau (sélectionnées à partir des résultats du volet 1) et (ii) des suspensions de légionelles après passage intra-amibien⁷.

Après culture dans les conditions définies dans le volet 1, les cellules bactériennes ont été inoculées dans les quatre qualités d'eau (~10⁸ cellules/ml) et ont été soit immédiatement aérosolisées (objectif 1, T0), soit incubées 11 jours à 37°C afin d'induire des changements physiologiques chez les bactéries, puis ensuite aérosolisées (objectif 2, T11j).

Les inocula bactériens (avant aérosolisation) et les prélèvements de l'aérosol ont été quantifiés selon les méthodes utilisées dans le volet 1.

A l'issue de ce volet, les conditions pertinentes pour l'étude de l'infectiosité des Lp Lens en aérosols sur le modèle murin ont été choisies.

3. Etude de la contamination sur un modèle murin

L'infectiosité des légionelles a été évaluée sur des lignées de cellules humaines⁸ et l'étude de la pathogénicité sur un modèle expérimental murin⁹.

La mise en place de ce 3^{ème} volet était conditionnée par la maîtrise technologique d'un banc d'aérobiocontamination. L'objectif assigné à ce dispositif était double : 1) infecter de façon reproductible des collectifs de souris par des aérosols stables ; 2) infecter des souris par aérosol avec différents phénotypes bactériens. Dans l'état actuel des compétences techniques des laboratoires publics de recherche français, il s'agissait d'un véritable challenge technique conciliant contraintes expérimentales, sécuritaires et éthiques¹⁰. L'outil mis en place a permis d'explorer en zone de laboratoire PIII les effets *in vivo* de la délivrance d'aérosols contenant l'isolat clinique *L. pneumophila* souche Lens (Lp Lens). Nous présentons les résultats obtenus (i) avec les aérosols générés à partir de Lp Lens dans l'eau minérale stérile (JOEvian) et ceux générés à partir de Lp Lens post-amibes (PA); et (ii) sur les deux derniers lots chronologiques où les conditions techniques de réalisation de l'expérience sont jugées par les opérateurs comme optimales.

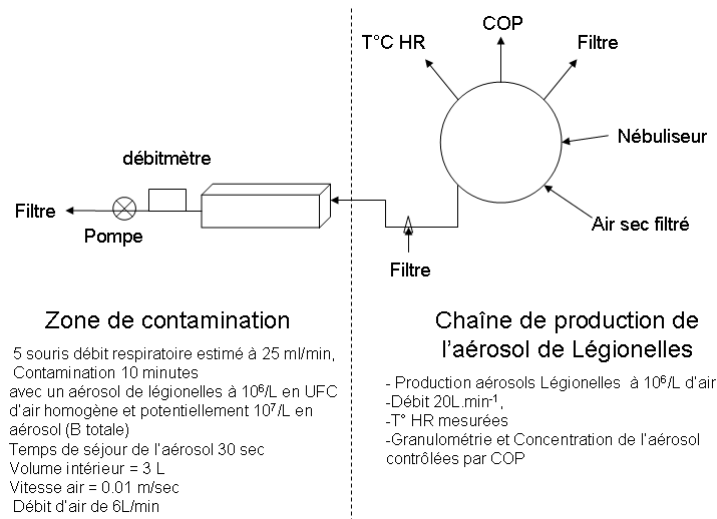


Figure 1. Description schématique du banc d'aérobiocontamination

T°C HR : sonde thermo hygrométrique

COP : compteur optique de particules

Le banc d'aérobiocontamination se compose d'une chaîne de production contrôlée d'aérosols bactériens similaire à celle décrite pour le volet 2 et d'une zone de contamination (**Figure 1**). Cette dernière consiste en une chambre

⁷ obtenues par coculture de Lp Lens avec *Acanthamoeba castellanii* pendant 96 h à 37°C.

⁸ sur amibe (*A. castellanii*) ; sur macrophage (monocytes U937) ; sur pneumocytes de type II (A549).

⁹ Le modèle *in vivo* utilisé est des souris A/J (laboratoire Harlan, UK) de 8 à 10 semaines (poids moyen 20 à 25g) indemnes de pathogènes opportunistes, porteuses du gène *Igfl1* leur conférant une susceptibilité à l'infection à *Legionella*.

¹⁰ Le dispositif d'aérobiocontamination a été installé en zone PIII du PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris) après obtention de l'agrément d'utilisation accordé par le Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard (Lyon)

permettant de contaminer simultanément jusqu'à 5 souris par expérimentation. Elle est associée en aval à un système déprimogène qui permet de régler le flux d'aérosols bactériens injectés dans la chambre et d'exposer ainsi les animaux à la dose désirée. La chambre d'exposition est constituée d'une zone de convergence par laquelle est introduit l'aérosol de Lp Lens et a pour intérêt d'assurer une distribution régulière de l'aérosol produit en amont¹¹. L'étanchéité¹² spécifique de la chambre d'exposition est assurée par une double filtration à l'aide de filtres à très haute efficacité disposés à des points terminaux. En outre, le banc est lui-même placé au sein d'une boîte à gants en pression négative contrôlée, avec une atmosphère constamment renouvelée par un air filtré en amont et aval; ce confinement permet d'assurer une barrière de protection supplémentaire pour l'expérimentateur et l'animalerie environnante.

Deux voies d'administration à la souris ont été comparées : la voie intra-nasale (IN) de référence et l'aérosolisation (AE). L'infection a été évaluée par la charge bactérienne dans le poumon et la dissémination systémique dans le foie et la rate.

B - Résultats

1. ÉCOLOGIE DES LEGIONELLES DANS L'EAU

1.1. La présence de MOD et de minéraux influence la survie des légionelles dans l'eau

Nous avons réalisé une série d'essais pour établir le comportement de la souche Lens, à différents temps et dans les eaux suivantes : ED (eau distillée), EM (eau minérale), ED+MO (ED + matières organiques à 2 mg de COT/L) et EM + MO. Ces eaux ont été stérilisées par filtration sur 0,2 µm avant inoculation par les légionelles.

Notre première série d'essais a été réalisée avec une charge bactérienne initiale de 10⁶ UCF/ml (**annexe 1**). Les résultats obtenus au cours de cette phase préliminaire montrent que les survies bactériennes observées ne paraissent pas significativement différentes, après 11 jours dans les différentes eaux testées. En accord avec ces observations, nous avons choisi de retenir deux durées pour nos essais en aérosols, T0 et T11 jours, c'est à dire respectivement immédiatement après la remise en suspension dans les eaux et 11 jours après celle-ci. Nous avons observé que les matières minérales semblent favoriser l'adhérence des légionelles sur les parois du polystyrène hydrophile ou sur le verre (ce qui peut masquer l'influence sur la survie) alors qu'en présence de polystyrène hydrophobe, il n'y a pas d'adhérence détectable aux surfaces. L'influence des matières minérales sur la survie des bactéries est non significative.

Nos premiers essais d'aérosolisation, en utilisant des suspensions de légionelles calibrées à 10⁶ UCF/ml, ne nous ont pas permis d'obtenir des charges suffisamment élevées. Nous avons donc choisi de travailler avec des suspensions de légionelles calibrées à 10⁸ UFC/ml. Nous avons donc testé cette nouvelle condition dans les différentes eaux retenues pour l'étude.

Dans ces conditions, les résultats apparents sur la survie sont différents de ceux obtenus avec des suspensions calibrées à 10⁶ UFC/ml. Nous n'avons pas d'explications claires à formuler pour rendre compte de ce phénomène, mais l'adhérence aux surfaces d'une fraction des bactéries, visible uniquement en présence de charges bactériennes faibles, pourrait en être la cause. L'incubation de 11 jours à 37°C de la souche Lens dans les quatre qualités d'eau a conduit à des modifications phénotypiques, que nous avons pu quantifier pour tous les paramètres mesurés (cultivabilité, intégrité membranaire des bactéries et hybridation moléculaire) (**Figure 2**).

Deux éléments majeurs ressortent de l'analyse de nos résultats :

- les taux de survie¹³ de légionelles, calculées pour les quatre qualités d'eau, montrent des différences contrastées pour trois d'entre elles : ED, EM et ED+MO. Les légionelles se comportant de manière similaire dans l'eau EM et EM+MO, cette dernière condition ne sera pas étudiée lors de la phase d'aérosolisation.
- les conditions de vieillissement de Lp Lens dans les quatre qualités d'eau ont permis de modifier de manière détectable leurs cultivabilités et intégrités membranaires (viabilité) avant aérosolisation. La détection des légionelles par hybridation in situ (FISH) n'apparaît pas comme un paramètre suffisamment discriminant (résultats non montrés) de la physiologie des légionelles en suspension pour qu'il soit pertinent de le conserver lors de la caractérisation des aérosols.

¹¹ Cet aspect a été validé par des mesures de vitesse et de répartition des particules biologiques dans le volume et permet de maintenir des conditions d'exposition stable sur la durée d'expérimentation, quel que soit l'emplacement des animaux dans ce volume.

¹² vérifiée et validée selon la norme NF EN 14-175.

¹³ concentration en Lp cultivable / totales ; concentration Lp viable / totales ; concentration Lp hybridées / totales

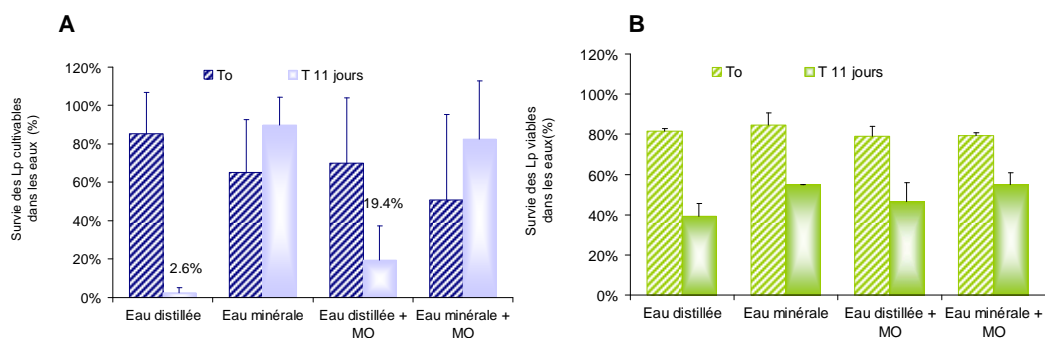


Figure 2. Taux de survie des légionelles cultivables (A), légionelles viables (B) parmi la population totale de légionelles, pour les quatre qualités d'eau testées. Chaque histogramme représente la moyenne et l'écart type associé (n = 4 à 8).

En conséquence, dans la suite du rapport, nous avons choisi de présenter les résultats de survie après aérosolisation obtenus pour des états physiologiques dans l'eau très contrastés : eau distillée, eau minérale et eau distillée + MO.

2. DEVENIR DES LEGIONELLES EN AEROSOLS

2.1. Aucun impact de la MO et des minéraux de l'eau sur l'aérosolisation des légionelles

Dans les conditions opératoires et aux concentrations testées, la présence de matières organiques et minérales dans l'eau impacte peu ou pas la survie des légionelles lors de la phase d'aérosolisation. L'effet "qualité d'eau" n'est pas significatif sur la survie de l'aérosol bactérien, évaluée selon l'intégrité membranaire et la cultivabilité des cellules. Seule l'eau distillée stérile (ED) tend à altérer davantage la capacité à cultiver des légionelles aérosolisées (**Figure 3**).

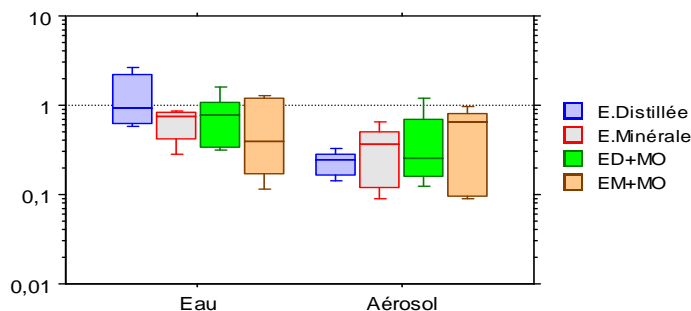


Figure 3. Ratio (%) du nombre de légionelles cultivables (UFC) sur le nombre total de légionelles totale dans les quatre types d'eau (ED, EM, ED+MO et EM+MO) et les aérosols correspondants (n = 6 /diagramme en boîte).

2.2. L'état physiologique de *L. pneumophila* Lens dans le réservoir hydrique influence sa survie en aérosol

La **figure 4** rassemble les données relatives à la survie des légionelles dans les aérosols, en fonction des conditions appliquées pour l'obtention d'états physiologiques différents des légionelles en suspension avant aérosolisation. Deux points remarquables apparaissent suite à l'analyse de ces résultats :

- un effet du transfert eau/air sur la survie (cultivabilité et intégrité membranaire) des légionelles moins important sur des suspensions de légionelles après vieillissement dans l'eau (T11 jours) que sur des suspensions fraîchement préparées (T0) (Figure 4A).
- le passage intra-ambien des légionelles, connu pour s'accompagner d'évolutions phénotypiques, apparaît aussi ici comme favorisant la survie des légionelles aérosolisées. La forte cultivabilité (77 % ± 21 %) des légionelles issues d'une multiplication intra-ambiennne dans les aérosols est comparable à celle observée dans les inocula de départ. L'absence de perte de cultivabilité de ces légionelles post-ambiennes lors du transfert eau/air semble témoigner de leur meilleure résistance aux stress liés à l'aérosolisation.

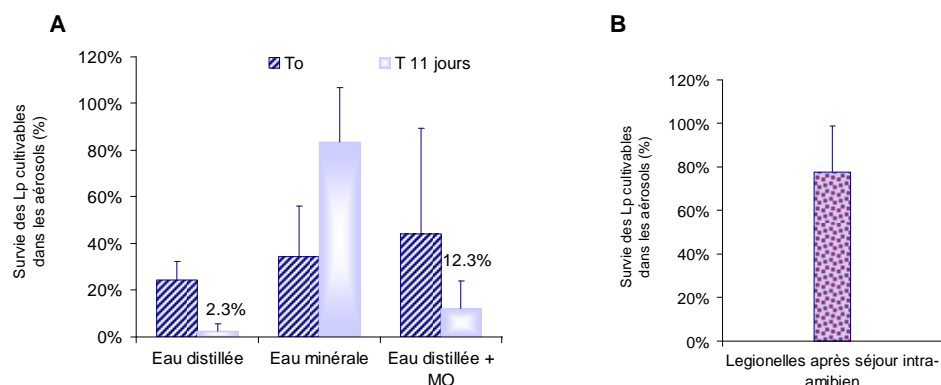


Figure 4. Taux de survie des légionelles cultivables parmi la population totale de légionelles dans les aérosols (A) générés à partir de trois qualités d'eau et (B) générés à partir d'une co-culture de 96 h Lp Lens /A. castellanii. (n = 5)

3. CONTAMINATION DE L'HOTE

3.1. Une meilleure délivrance et multiplication pulmonaires des légionelles par la voie aéroportée

Les valeurs de quantification bactérienne en pré- (inoculum bactérien) et post-AE (prélèvement contrôle de l'aérosol) indiquent que nous avons pu mettre en œuvre des quantités bactériennes similaires lors des essais, soit une exposition moyenne de 10^6 légionelles cultivables/L d'air (**Figure 5a**). Des bactéries cultivables dans les poumons murins à T0 ont été isolées sur les groupes AE, mais le nombre est significativement inférieur par rapport aux groupes témoin IN, indiquant une délivrance bactérienne inférieure à nos prévisions *via* aéroportée (**Figure 5b**). Nos résultats montrent donc que l'outil développé a permis la contamination des souris par Lp Lens par voie aéroportée. Néanmoins, des ajustements restent nécessaires puisque l'objectif de la délivrance d'une même quantité de bactéries (10^6 UFC/ souris) par voie IN ou AE n'a pas été atteint.

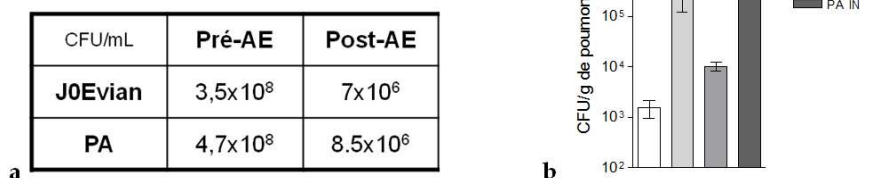


Figure 5. Caractérisation des échantillons bactériens aéroportés et de la quantité de bactéries délivrée au niveau pulmonaire dans le modèle murin

Nombre de bactéries cultivables (a) dans l'aérosol test avant et après aéroportation ; (b) dans les homogénats de poumons murins à T0 dans les différents groupes expérimentaux

J0Evian : suspensions de *L. pneumophila* Lens dans l'eau d'Evian stérilisée par filtration

PA : suspensions de *L. pneumophila* Lens obtenues par culture dans les amibes (post-amibe)

AE : exposition par voie aéroportée ; IN : exposition par voie intranasale

(T-test, * p < .05)

Dans toutes nos conditions testées, 48h après l'exposition des souris aux légionelles, une croissance bactérienne significative est observée dans les poumons murins, sauf pour la condition « Evian intranasale » (**Figure 6a**). Ces données sont corroborées par les données de PCR quantitative qui montrent la même tendance, en particulier sur les groupes « aéroportés » (**Figure 6b**).

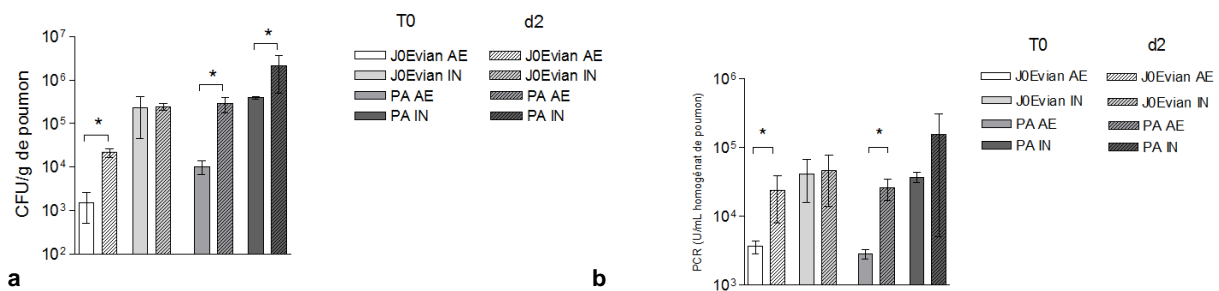


Figure 6. Dénombrement des légionelles dans les poumons, immédiatement et 48h après infection

(a) Nombre de bactéries cultivables par gramme de poumons ;

(b) Nombre d'unités génome par mL dans les homogénats de poumons murins à T0 et à 48 h post-infection (d2) dans les différents groupes expérimentaux.

T0 : 3 heures après exposition ; d2 : 48 h après l'exposition

Autres légendes : voir figure 6

T-test, * p < .05.

Le calcul du facteur de multiplication de Lp Lens dans les poumons murins montre qu'il est nettement plus élevé dans le groupe AE, quelle que soit la condition, suggérant une meilleure « pénétration » de l'inoculum bactérien jusqu'au poumon profond (Tableau 1). De plus, pour les deux modalités d'administration, la condition PA génère le facteur de multiplication le plus élevé.

		Fold increase
AE	J0Evian	13,99
	PA	27,83
IN	J0Evian	1,07
	PA	5,4

Tableau 1. Facteur de multiplication des bactéries cultivables dans les poumons murins entre T0 et 48h post-infection dans les différents groupes expérimentaux.

Légendes : voir figure 6

L'évaluation des lésions pulmonaires et de la dissémination extra-pulmonaire est présentée dans l'**annexe 2**.

Pour le volet *in vivo*, les conditions de réalisation extrêmement contraignantes de mise au point d'une chambre d'exposition d'animaux de classe de risque III et d'autorisation de mise en fonctionnement au sein d'une animalerie n'ont permis l'obtention que de résultats préliminaires.

Néanmoins, ces résultats permettent de poser plusieurs hypothèses de travail selon que l'on s'intéresse aux voies d'administration (aérosols -AE, intranasal -IN) ou aux phénotypes bactériens (suspension dans l'eau d'Evian -J0Evian, suspensions post-amibe -PA).

Tout d'abord, le meilleur facteur de multiplication pulmonaire obtenu dans les groupes AE (*versus* groupes IN) indique un impact positif de la voie « aérosol » sur la multiplication bactérienne intrapulmonaire posant l'hypothèse d'une diffusion accrue dans les poumons.

La comparaison des phénotypes J0Evian *versus* PA et le facteur de multiplication intrapulmonaire élevé de Lp Lens PA suggèrent une meilleure résistance de ce phénotype à la délivrance *via* aérosol ou une meilleure résistance aux mécanismes de clairance immuno-induits.

Concernant l'impact de la multiplication dans les amibes, nos résultats obtenus par voie aérosol confirment les données de la littérature, générées soit sur cultures cellulaires [11], soit sur modèle animal mais par injection intratrachéale [12].

3.2. Une cytotoxicité dépendante de la physiologie des légionelles

Les résultats révélant un effet pathogène majoré par un phénotype PA semblent corroborés en partie par les mesures de cytotoxicité réalisées sur les suspensions pré-AE. La cytotoxicité des légionelles post-amibes augmente en effet dans les macrophages (Figure 7B) et les pneumocytes (Figure 7C), mais ne semble pas influencer leur capacité à infecter de nouveau les amibes (Figure 7A). Ainsi, les légionelles post-amibes se sont plus rapidement multipliées

dans les 24 heures suivant l'infection des co-cultures avec les pneumocytes et les macrophages que les légionelles en suspension dans l'eau d'Evian (pendant 0 et 11 jours).

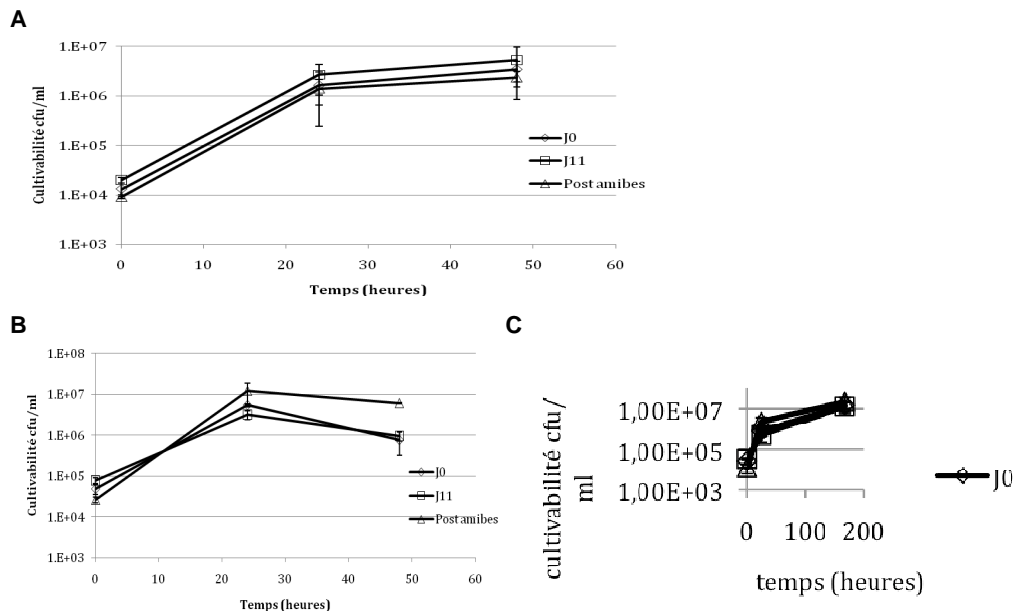


Figure 7. Infection de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* (A), de pneumocytes II (A549) (B) et de macrophage (monocytes U937 différencié) (C) par la souche *L. pneumophila* Lens (J0 et J11 correspondent à des légionelles placées dans l'eau d'Evian pendant respectivement 0 et 11 jours) (n ≥3)

Conclusion

Le but de cette étude était d'améliorer notre compréhension des processus influençant la survie des légionelles dans les aérosols et de mettre en place un moyen technique permettant de mieux évaluer le risque associé à cette voie d'exposition.

Dans le cadre d'un tel projet, nous avons dû sélectionner les paramètres qui nous sont apparus les plus pertinents, au fur et à mesure du déroulement du projet.

Concernant le premier volet, nous avons pu observer un rôle particulier des minéraux dans l'adhérence aux surfaces. La réalisation du deuxième volet nous a permis de déterminer les conditions les plus pertinentes à mettre en œuvre lors du troisième volet. Notre approche montre un impact de l'état physiologique des légionelles sur leur comportement dans les aérosols. Cette étude exploratoire n'a permis qu'un éclairage partiel qui paraît pourtant, au travers de nos résultats, extrêmement pertinent. Ce point pourrait permettre une meilleure compréhension du comportement des légionelles dans les aérosols et ainsi d'envisager de mieux cibler les actions préventives dans les installations à risques (qui pourraient par exemple passer, par la maîtrise des populations de protozoaires, etc.). Enfin, nous avons pu mettre en œuvre avec succès, et dans des conditions d'accès complexes et fortement réglementées, une chambre d'aérobiocontamination de classe de risque 3, dans les locaux d'une animalerie. Compte tenu des contraintes expérimentales rencontrées, il n'a été question que d'une approche préliminaire de l'exposition du modèle animal à l'aérosol bactérien. Néanmoins, nos résultats montrent des perspectives intéressantes sur le plan de l'évaluation du risque. La plupart des études concernant les effets pathogènes de légionelle chez l'hôte reposent sur des méthodes d'instillation intranasale. La contamination se faisant par respiration d'aérosols contaminés, la question pouvait se poser quand à la pertinence de ce modèle. La levée de ce verrou technique nous a permis de montrer que l'infection de l'animal par voie aérosol intervenait à des doses plus faibles que par voie intranasale. Il nous semble nécessaire de poursuivre ces essais pour mieux déterminer la dose infectante et le risque d'exposition aux aérosols de légionelles. D'ores et déjà, nos résultats suggèrent qu'une réelle prise en compte du compartiment aérien doit être engagée. Et, compte tenu de l'absence de corrélation entre les concentrations en légionelles mesurées dans le réservoir et celles retrouvées dans l'air auxquelles les populations sont réellement exposées, la maîtrise des seuils réglementaires dans l'eau, ne doit constituer le seul levier d'action pour ce risque biologique. Des actions complémentaires portant par exemple sur une surveillance de la qualité microbiologique de l'air à proximité des installations à risque devraient être davantage étudiées.

Remerciements

Le programme LEGIOAEROPATHO a bénéficié d'un soutien ARN SEST2006. Les auteurs remercient Marie Teixeira, Jean-François Henry, Céline Angleraux, Jean-Louis Thoumas du PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, ENS de Lyon).

Références

- [1] Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M. and Messi, P. (2005). Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* 11, 355-80.
- [2] Greub, G. and Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17, 413-33.
- [3] Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15, 506-26.
- [4] Benhamou, D., Bru, J.P., Chidiac, C., Etienne, J., Leophonte, P., Marty, N., Poirier, R. and Rouquet, R.M. (2005). Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment. *Med Mal Infect* 35, 1-5.
- [5] Berendt, R.F. (1980). Survival of *Legionella pneumophila* in aerosols: effect of relative humidity. *J Infect Dis* 141, 689.
- [6] Dennis, P.J., Wright, A.E., Rutter, D.A., Death, J.E. and Jones, B.P. (1984). *Legionella pneumophila* in aerosols from shower baths. *J Hyg (Lond)* 93, 349-53.
- [7] Hambleton, P., Broster, M.G., Dennis, P.J., Henstridge, R., Fitzgeorge, R. and Conlan, J.W. (1983). Survival of virulent *Legionella pneumophila* in aerosols. *J Hyg (Lond)* 90, 451-60.
- [8] Archer, K.A. and Roy, C.R. (2006). MyD88-dependent responses involving toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of *Legionella pneumophila* in a mouse model of Legionnaires' disease. *Infect Immun* 74, 3325-33.
- [9] Ader, F. et al. (2008). In vivo effect of adhesion inhibitor heparin on *Legionella pneumophila* pathogenesis in a murine pneumonia model. *Intensive Care Med* 34, 1511-9.
- [10] 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 (FISH). *J. Environ. Monitoring* 9, 91-97.
- [11] Cirillo, J.D., Falkow, S. and Tompkins, L.S. (1994). Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 62, 3254-61.
- [12] Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S. and Tompkins, L.S. (1999). Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 67, 4427-34.
- [13] Schuster FL (2002) Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* 15:342-354