
LEGIONELLA : ECOLOGIE, DETECTION, IDENTIFICATION, VIRULENCE

M Reyrolle, S Jarraud, J Etienne




*Centre National de Référence des Légionelles
Hôpital Edouard Herriot - 69437 Lyon Cedex 03*

Introduction

Je vais vous parler de l'actualité et des nouvelles données que nous avons recueillies à la conférence internationale des *Legionella* qui a eu lieu à Ulm en septembre 2000.

Ecologie

LEGIONELLA, LEGIONELLOSES

-  45 espèces, 50 en 2000, 80 en réalité ?
-  plus de 20 espèces retrouvées chez l'homme
-  *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 responsable de
 - 90 % des légionelloses épidémiques
 - 20 % à 30% de mortalité des cas nosocomiaux

Combien y a-t-il d'espèces ?

Quarante-cinq en France, presque 50 depuis septembre 2000, et près de 80 pour un auteur australien. Parmi les 45 connues en France, plus de 20 espèces ont été retrouvées chez l'homme, mais *Legionella pneumophila* (Lp) est responsable de plus de 90% des légionelloses diagnostiquées en France et les épidémies jusqu'à ce jour ont été à Lp séro-groupe 1 (Lp1), responsable de 20 à 30 % de mortalité dans les cas nosocomiaux.

Où se trouvent les *Legionella* ?

On les connaît bien dans l'eau : eaux thermales, eaux potables, mais ce qui était moins connu c'est qu'elles peuvent se trouver dans la terre et dans le sable ; elles ont été responsables de cas cliniques au Japon et en Australie à partir d'activités de jardinage. Le réservoir naturel bien connu est l'eau. Trente à 90% des prélèvements seraient positifs au niveau des sites naturels, contamination importante possible au niveau des réseaux d'eau - jusqu'à 10⁴ ou 10⁶ - ; les lacs, les rivières, les puits peuvent être contaminés,

également les sols comme cela vient d'être évoqué. Leur multiplication est favorisée par la chaleur au delà de 30° et au dessous de 60°, ce qui s'observe dans les eaux chaudes thermales.

COLONISATION DES RÉSEAUX D'EAUX

- ☉ Taux de colonisation
 - Hôpitaux 60% à 80%
 - Maisons individuelles, peu connu : 10% à 30%
- ☉ Type de colonisation
 - 10^2 à 10^7 UFC/L
 - Stabilité 1 à 5 ans et plus
 - Lp 1, Lp1 - Lp3, Lp sg et Lnp

Biofilms. Ce qui permet aux *Legionella* de résister dans des milieux parfois hostiles et dans des tuyauteries, c'est leur aptitude à se nicher dans les biofilms qui tapissent les tuyaux. Ces biofilms sont des milieux très complexes où les *Legionella* trouvent des nutriments. Elles sont parfois à l'état libre, parfois intracellulaires et alors protégées, pouvant se multiplier dans les protozoaires et les amibes. La nature des tuyaux favorise le développement des biofilms (PVC, PEHD, polyéthylène) et augmente donc la possibilité de retrouver des *Legionella* nichées dans ces tuyaux.

Détection

Quelles sont les techniques de détection des *Legionella* ?

DÉTECTION DES LEGIONELLES DANS L'ENVIRONNEMENT

- ☉ Techniques de détection dans l'air
 - aspirations sur géloses, expérimentales
- ☉ Techniques de détection dans l'eau
 - culture : norme AFNOR T90-431
 - norme ISO 11731 : 50 UFC/l
 - PCR plus sensible : 92% d'échantillons positifs
 - CMF, CIBL : bactéries non cultivables

Dans l'air, il n'y a pas de technique normalisée de détection. Quelques essais ont été faits mais sont restés expérimentaux.

Dans l'eau, les techniques de culture sont définies par la norme AFNOR de 1993, en cours de révision, et la norme internationale, les deux normes ayant un seuil de détection de 50 unités formant colonie par litre (UFC/l). La *Polymerase chain reaction* (PCR) est utilisée à titre expérimental en l'absence de réactif commercialisé. Une étude a montré que 92% des échantillons seraient contaminés d'après une technique de PCR. D'autres techniques seraient plus sensibles et aptes à détecter les bactéries non cultivables mais potentiellement pathogènes : c'est la cytométrie de flux et la cytométrie d'image en balayage laser, techniques en cours d'expérimentation.

La technique de détection par culture comporte une concentration par filtration, une remise en suspension et l'ensemencement sur milieux spéciaux. Résultats définitifs au 10^{ème} jour, certaines souches potentiellement pathogènes poussant moins vite que *Lp* (les *L* non pneumophila trouvées chez l'homme : *Longbeach*, *Gormani* ; certaines ne cultivant pas du tout comme *L Falloni*). La liste des espèces est sur site Internet depuis septembre 2000.

Quand la filtration est difficile (eaux thermales, eau de tours réfrigérantes) la sensibilité passe à 100 UFC/l.

Identification

Il s'agit d'identifier non plus les espèces mais les souches à l'intérieur des espèces ou d'un sérotype. Au centre de référence nous utilisons l'immunofluorescence en 1^{er} screening. L'existence de réactions croisées conduit à faire appel à des techniques de biologie moléculaire et autres qui vont jusqu'au séquençage de certains gènes.

TYPAGE MOLÉCULAIRE DES SOUCHES



Techniques : PFGE, AP PCR, ribotype, AFLP, MLST



Buts :






- comparer les souches de malades
- identifier une source de contamination
- repérer les souches épidémiques

Le typage se fait au niveau de la molécule d'ADN par des techniques comme le champ pulsé du ribotypage ou de l'AFLP (amplified fragment length polymorphism), ou du PFGE (pulsed field gel electrophoresis) ou du MLST (multilocus sequence typing), ou encore de l'AP-PCR (arbitrary priming PCR). On peut comparer des souches de malades, identifier une source de contamination, repérer les souches épidémiques, ou suivre l'évolution d'un écosystème.

Ces techniques sont bien au point. Ce sont des marqueurs épidémiologiques. Elles nous permettent d'avoir une banque de données avec un pouvoir discriminant assez bon, évalué au niveau européen comme supérieur à 0,96. Notre banque de données comprend

2.500 souches dont 400 souches cliniques. On a le pulsotype, c'est à dire le marqueur génomique pour les épidémies. La technique dure 5 jours et permet d'identifier la souche mais sans apporter de précision sur la pathogénicité ou la virulence. Ce n'est qu'une fenêtre sur le génome.







BANQUE DE DONNÉES AU CNRL

-  Technique PFGE : $D > 0.96$
-  2500 souches, dont 500 souches cliniques
-  Les pulsotypes peuvent être : uniques, ou épidémiques, ou nosocomiaux
-  Logiciel Taxotron IPP
-  Matcher toutes les souches cliniques et environnementales

Virulence

Les gènes de virulence des légionelles sont bien connus ; 25 gènes ont été séquencés et tous jouent un rôle dans la virulence : les gènes du métabolisme de base *cat* (catalase), *omp* (protéines majeures de la paroi) ; les *housekeeping genes* qui sont des gènes de "ménage" et qui permettent la multiplication intra-cellulaire (*mip*, *dot*, etc.) ; les gènes qui codent pour des facteurs d'attachement de la bactérie (*pil*, *fla*) et les gènes "réparateurs" (*recA*, *recB* etc.) ; ces gènes pouvant être proches sur le génome et s'organiser en îlots de pathogénicité.

LES GÈNES DE VIRULENCE

-  plus de 25 gènes connus et séquencés
-  *L pneumophila* : génome 4Mb
-  métabolisme de base (*omp*, *lly*, *sod*, *cat*)
-  facteurs de virulence : housekeeping genes (*mip*, *icm*, *dot*, *fur*)
-  formation des pili et des flagelles (*pil*, *fli*, *fla*)
-  régulateurs, réparateurs (*hsp*, *recA*, *recB*)

Par ailleurs le génome entier de *Legionella pneumophila* sérotype 1 a été séquencé et il peut être visualisé sur le site Internet : <http://genome3.cpmc.columbia.edu>. Il a une taille de 4 mégabases, et les gènes impliqués dans la virulence pour d'autres bactéries sont signalés.

Les connaissances sur les légionelles ont beaucoup avancé mais il n'existe pas de technique simple à l'heure actuelle pour repérer les légionelles virulentes dans un prélèvement d'eau.

Conclusion

En conclusion, seules des perspectives peuvent être évoquées :

Le taux de légionelles admissible dans une eau n'est pas défini de façon claire car il dépend de l'évaluation du risque et comme la pathogénicité des souches n'est pas repérable ce risque est difficile à évaluer.

La surveillance renforcée des cas de pneumopathies avec le diagnostic rapide de légionelloses est une priorité.

Les recherches actuelles vont vers des méthodes plus sensibles de détection des légionelles dans l'eau : CIBL, puces ADN et le marquage des souches pathogènes.

